

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Fisiología
(Fisiología Animal II)



TESIS DOCTORAL

**Avances en la creación de un modelo experimental de ELA esporádica
en rata mediante el tratamiento con β -N-metilamino-L-alanina (L-
BMAA)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estefanía de Munck García

Directores

Rosa María Arahuetes Portero
Begoña Gómez Miguel
M^a Teresa Solas Alados

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Fisiología
(Fisiología Animal II)



TESIS DOCTORAL

**Avances en la creación de un modelo experimental de ELA esporádica
en rata mediante el tratamiento con β -N-metilamino-L-alanina (L-
BMAA)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estefanía de Munck García

Directores

Rosa María Arahuetes Portero
Begoña Gómez Miguel
M^a Teresa Solas Alados

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Fisiología Animal II

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica)



**AVANCES EN LA CREACIÓN DE UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ELA ESPORÁDICA EN RATA
MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON β -N-METILAMINO-L-
ALANINA (L-BMAA)**

TESIS DOCTORAL

Estefanía de Munck García

Madrid, 2014



La Dra. ROSA M^a ARAHUETES PORTERO, profesora titular del Departamento de Fisiología Animal II, la Dra. BEGOÑA GÓMEZ MIGUEL, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, y la Dra. M^a TERESA SOLAS ALADOS, profesora titular del Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica), todas ellas pertenecientes a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que Dña. ESTEFANÍA DE MUNCK GARCÍA, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral, titulado “AVANCES EN LA CREACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE ELA ESPORÁDICA EN RATA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON β -N-METILAMINO-L-ALANINA (L-BMAA)” y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación.

LAS DIRECTORAS

Fdo.

Rosa M^a Arahuetes Portero

Fdo.

Begoña Gómez Miguel

Fdo.

M^a Teresa Solas Alados



A todos los que estuvieron,
a los que están y a los que
vendrán.



AGRADECIMIENTOS

Después de pasar tanto tiempo en el mismo sitio siempre me asalta la misma sensación, es la inquietud que señala el cierre de un ciclo, los aires de cambio. Aunque muchas veces parece que el momento nunca va a llegar un día te levantas y piensas “he terminado”, con la consiguiente satisfacción personal que ello conlleva. Desde luego, no hubiera sido posible llegar a este punto sin el apoyo de toda la gente que me rodea y que de una forma u otra ha hecho posible la realización de este trabajo. Con mi mala memoria posiblemente no están todos los que son, pero seguro que si son todos los que están.

Para empezar, me gustaría agradecer a la Fundación MEDINA, al CSIC y a FUNDELA su apoyo financiero y la confianza depositada en nuestro grupo de investigación, ELA-UCM. Gracias, sobretodo, por aguantar el tirón en los tiempos que corren, por vuestra gran aportación a la actividad investigadora y la ayuda que ello supone para las personas que padecen enfermedades “raras”.

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la gran experiencia y el saber hacer de mis directoras de tesis. Juntas empezamos la aventura de un nuevo proyecto con el entusiasmo del novato y llegamos al final del camino con el conocimiento del experto. A las tres, Rosa, Begoña y Maite, muchas gracias por vuestra paciencia, por todo lo que he aprendido y por intentar sacar siempre adelante nuestro trabajo contra viento y marea, se viniera lo que se viniera encima.

Sin lugar a dudas, una de las personas más importantes para mí durante todo este tiempo ha sido mi querida *simbionte*. Es increíble llegar a alcanzar tal grado de compenetración con alguien que llegues a pensar lo mismo al mismo tiempo. No sé si volveré a trabajar alguna vez con alguien con quien me complementa tan bien, con los *feedbacks* que hemos establecido, pero sé que me quedo con una gran amiga Emma.

He de mencionar todas las fuentes de las que he bebido durante estos años para poder llevar a cabo este trabajo. Gracias a las profesoras M^a Teresa Antonio y Meritxell López y, por supuesto, a sus chicos (Amparo, Javier, Sara...), por compartir con nosotras su sabiduría y sus recursos. Gracias también a los departamentos de Fisiología Animal II, de Bioquímica y Biología Molecular I y de Biología Celular por acogernos para la

realización de este proyecto. Especialmente, gracias a todas las personas con las que he compartido mi día a día en la planta 13, Ana, Teresa *de mañana* y Teresa *de tarde*, y todos los que creáis ese gran ambiente de trabajo. Muy especialmente a Ana José, aunque se fue hace tiempo, que además de haber sido mi presentadora en el departamento es una gran amiga.

Además, han jugado un papel muy importante los CAIs de la UCM con los que hemos trabajado codo con codo. Gracias al Animalario de la facultad de Biología, porque siempre estáis dispuestos a echarnos un cable. También a Marisa y Agustín, del CAI de Microscopía Electrónica, que tanto nos han ayudado en estas lides. No puede faltar tampoco David y Palmira, del CAI de Resonancia Magnética, por esas magníficas adquisiciones.

Una mención especial se merecen mis padres, que han aguantado a esta doctoranda en sus horas altas y en las bajas, dándome todo su apoyo, sin el cual este doctorado hubiera sido seguramente irrealizable. Gracias a mis hermanos, Cecilia, Sonia, Tito y Víctor, que siempre han estado a mi lado a pesar de haber elegido un camino totalmente distinto al mío, y con los que he compartido y aprendido tantas cosas.

Por supuesto, tengo un agradecimiento especial para todos los grandes amigos que empezaron conmigo la carrera o a los que he ido conociendo a lo largo de todos estos años: Laura, Gise, Mario, Isa, Luz, Yulan,... (podría llenar páginas enteras). Porque conocéis el azaroso mundo de la ciencia y, estemos lejos o cerca, siempre he podido contar con vosotros. Sobre todo, gracias a esos espíritus críticos que te hacen plantearte las cosas más de dos veces, para que siempre seas consciente de lo que haces y por qué.

No puedo olvidar a esas personas que siempre me aportan esa perspectiva que tengo tendencia a perder, la de aquellos de mi misma generación que intentan abrirse paso en un mundo difícil sin darse por vencidos. Por ello, muchas gracias a mis amigos de Hortaleza.

Por último, pero no menos importantes, quiero darles las gracias a las que para mí son un claro ejemplo de esfuerzo y tenacidad, con las que he crecido y que me han ayudado a seguir adelante cuando todo estaba cuesta arriba. A mis mejores amigas Marta, Ana, Lara y Lis, gracias por estar ahí.

Ahora que se cierra este ciclo, recordando a toda la gente a la que debo tanto, espero poder corresponder aportando mi granito de arena al mundo de la ciencia.

RESUMEN:**Introducción:**

El L-BMAA es un aminoácido no proteico, altamente neurotóxico, producido por la mayoría de las cianobacterias (Cox *et al.*, 2005; Banack *et al.*, 2007) y por diatomeas (Jiang *et al.*, 2014). Estos organismos están ampliamente distribuidos, encontrándose en muy diversos ambientes a lo largo de todo el mundo. Así pues, el L-BMAA ha sido detectado en gran cantidad de ecosistemas acuáticos y terrestres, existiendo numerosas pruebas de su bioacumulación en las redes tróficas. Por lo tanto, los humanos pueden estar expuestos a esta neurotoxina mediante la ingesta de alimentos contaminados, por el agua de bebida, las aguas recreacionales e incluso por inhalación.

Se ha demostrado que el L-BMAA se puede incorporar erróneamente a las proteínas en lugar de la L-serina (Dunlop *et al.*, 2013), de forma que se crea un reservorio neurotóxico que se va liberando lentamente con el metabolismo proteico. Además, este aminoácido atraviesa tanto la barrera hematoencefálica como la barrera placentaria y puede transferirse a los neonatos a través de la leche materna, por lo que la exposición puede iniciarse a edades muy tempranas afectando al desarrollo normal del sistema nervioso central.

En cuanto a los mecanismos patofisiológicos, se sabe que el L-BMAA reacciona con el dióxido de carbono (CO₂) bajo condiciones fisiológicas formando un aducto carbamilado, el β -(N-carboxi-N-metil)-amino-L-alanina (BMAA- β -NCO₂), que presenta una gran similitud estructural con el glutamato, por lo que se propuso como el principal responsable de la actividad excitotóxica del L-BMAA. Este aducto carbamilado actúa sobre los receptores de glutamato NMDA, AMPA y los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). Además, se ha sugerido que la distinta susceptibilidad de los diferentes tipos neuronales a este aminoácido podrían depender de los subtipos de receptores de glutamato que expresan (Liu *et al.*, 2010).

Por otro lado, el L-BMAA puede actuar sobre el sistema xc-, tanto mediante la inhibición de la toma de cistina como incrementando la liberación de glutamato, lo que contribuye a la muerte neuronal.

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una parálisis muscular progresiva que refleja la degeneración de las neuronas motoras en el córtex motor primario, los tractos corticoespinales, el tronco encefálico y la médula espinal (Wijesekera y Leigh, 2009). La mayoría de los casos de ELA son esporádicos, pero aproximadamente del 5-10% de los casos son familiares.

Las motoneuronas sufren una serie de eventos anómalos como la desregulación de la homeostasis proteica celular, la afectación del proceso de autofagia, la formación de agregados proteicos, el estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial, la formación de proteínas aberrantes, la disfunción del transporte axonal y el desensamblaje del citoesqueleto, así como el fallo sináptico (Robberecht y Philips, 2013). Como sucede en otras enfermedades neurodegenerativas, parece que la degeneración neuronal en la ELA se debe a una compleja interacción entre múltiples mecanismos celulares patogénicos que no tienen por qué ser mutuamente excluyentes.

La afectación neuronal en la ELA conduce a una alteración en los sistemas de neurotransmisión, que se refleja en un fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal. Adicionalmente a este fenómeno, las alteraciones en los niveles de neurotransmisores en enfermos de ELA han sido ampliamente estudiadas, detectándose niveles alterados de varios neurotransmisores como el glutamato, el GABA y la taurina (Perry *et al.*, 1987; Malessa *et al.*, 1991).

En cuanto a la exploración de los mecanismos moleculares de esta enfermedad, dos proteínas han cobrado gran relevancia en los últimos tiempos. GSK3 es una kinasa ampliamente implicada en numerosos procesos neuronales y las alteraciones en sus niveles de expresión han sido relacionadas con varias enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas. Por otro lado, TDP-43 es el principal componente de las inclusiones ubiquitina-positivas encontradas en el cerebro de pacientes con ELA (Nonaka *et al.*, 2009) y es uno de los pocos biomarcadores de la enfermedad.

A pesar de que la mayoría de los casos de ELA son de etiología esporádica, hasta el momento los únicos modelos animales aceptados para su estudio están basados en las mutaciones genéticas detectadas en la ELA familiar. Aunque existen numerosos

estudios sobre la toxicidad del L-BMAA *in vivo* y a pesar de las crecientes evidencias de su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, nunca antes se había descrito un modelo animal de ELA esporádica mediante la administración de este neurotóxico.

Objetivo:

El aminoácido neurotóxico β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) ha sido propuesto como uno de los principales causantes de la aparición de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) esporádica. En la actualidad no existe un modelo específico y validado para el estudio de esta enfermedad neurodegenerativa. Por lo tanto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de un modelo *in vivo* de ELA esporádica en ratas mediante la administración de L-BMAA.

Resultados y discusión:

Para la obtención de efectos neurológicos que mimeticen los presentados en la ELA, se seleccionó el tratamiento más adecuado con L-BMAA: con ratas de 21 días de edad (en el momento del destete), con dosis i.p. entre 200-300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos. Dichos efectos evolucionan en una fase inicial rápida, dentro de los 3 primeros meses postratamiento, seguida de una fase más estable en la que los síntomas se van desarrollando de forma progresiva.

El tratamiento seleccionado con L-BMAA no altera el normal desarrollo físico de los animales y, aunque afecta al hígado y al riñón, los principales órganos detoxificadores del organismo, incrementando el estrés oxidativo, no pone en peligro su funcionamiento. Por lo tanto, los efectos deletéreos observados no se deben a otros factores externos al sistema nervioso central, validando este modelo para el estudio de los efectos centrales del L-BMAA.

Los animales tratados con L-BMAA presentan fallos en la coordinación y el control motor que se asemejan a los que presentan los pacientes de ELA. Los efectos motores observados pueden deberse a una pérdida de control desde el sistema nervioso central, que se refleja en los diversos signos de neurodegeneración encontrados:

- a) Adelgazamiento selectivo de la corteza motora que podría implicar una pérdida de parénquima nervioso en esta área.
- b) Agrandamiento de los ventrículos que está relacionado con la activación del sistema inmune y con el compromiso de la BHE.
- c) Disminución del volumen muscular que puede reflejar la atrofia de este tejido por pérdida de inervación desde la médula espinal.
- d) Hiperintensidad marcada en las imágenes de resonancia magnética en determinados núcleos bulbares implicados en la deglución.
- e) La alteración del N-acetilaspártato (NAA) y sus cocientes relacionados, es decir, N-acetilaspártato/Creatina (NAA/Cr), N-acetilaspártato/Colina (NAA/Cho) y NAA/Cr+Cho, como indicadores de procesos neurodegenerativos.

La neurodegeneración observada por el tratamiento con L-BMAA puede deberse a los daños causados en los orgánulos celulares, como los implicados en la vía secretora, es decir, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Estos daños se producen por la acumulación de proteínas mal plegadas, reflejadas en los acúmulos de TDP-43. Además, también se aprecian daños en las mitocondrias, posiblemente debidos a que los efectos excitotóxicos del L-BMAA provoquen una subida de las especies reactivas de oxígeno que dañan a este orgánulo.

Los citados efectos del L-BMAA sobre los orgánulos celulares desencadenan procesos autofágicos, señalados por el incremento de LC3 y de P-mTOR. Finalmente, el daño neuronal prolongado da lugar a la muerte celular por apoptosis, señalada por la presencia de caspasa-3 activada en la médula espinal lumbar.

Por otra parte, las ratas tratadas con L-BMAA presentan otros rasgos relacionados con la ELA, como la alteración de los niveles de neurotransmisores que implican daños a largo plazo en los sistemas glutamatérgico y GABAérgico. Además, también aparece una alteración transitoria en los niveles de taurina que podrían estar relacionados con un sistema de defensa del sistema nervioso central frente a la excitotoxicidad causada por el L-BMAA.

El tratamiento *in vivo* con L-BMAA también afecta a dos de los principales marcadores de enfermedades neurodegenerativas: GSK3 β y TDP-43. El aumento de los niveles de GSK3 β , total y fosforilada, puede jugar un papel clave en las cascadas de señalización que dan lugar a la degeneración neuronal. Además, los acúmulos de TDP-43 son una de las principales características de la ELA, y pueden tener una gran relevancia en el transcurso de la enfermedad.

Finalmente, se quiso comprobar la utilidad de este modelo para el ensayo de moléculas para el tratamiento de la ELA esporádica. De esta forma, se han obtenido resultados positivos mediante el tratamiento con el inhibidor de GSK3 VP2.51 desde el día PT1, consiguiendo la recuperación de los síntomas neurológicos de los animales tratados con L-BMAA y evitando la activación de los procesos autofágicos que, presumiblemente, son un paso previo a la neurodegeneración. Los resultados obtenidos con esta molécula terapéutica indica la idoneidad de este modelo para la realización de este tipo de ensayos.

Conclusiones:

Este estudio revela que las ratas tratadas con L-BMAA presentan una serie de características que mimetizan los rasgos fisiopatológicos de la ELA. En este modelo de ELA esporádica, la evolución progresiva de los síntomas y el hecho de que el tratamiento no tenga consecuencias letales en el largo plazo de tiempo estudiado para estos animales, al contrario de lo que sucede en los modelos genéticos de ELA familiar, hace factible el estudio en profundidad de los distintos estadios de la enfermedad y posibilita el ensayo de moléculas que puedan tratar o revertir los síntomas.

Bibliografía:

- Banack, S. A., Johnson, H. E., Cheng, R., Cox, P. A. (2007). "Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium." *Mar. Drugs.*, 5(4), 180-196.
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., Bergman, B. (2005). "Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(14), 5074-5078.

- Dunlop, R. A., Cox, P. A., Banack, S. A., Rodgers, K. J. (2013). "The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation." *PLoS. One.*, 8(9), e75376.
- Jiang, L., Eriksson, J., Lage, S., Jonasson, S., Shams, S., Mehine, M., Ilag, L. L., Rasmussen, U. (2014). "Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments." *PLoS. One.*, 9(1), e84578.
- Liu, X. Q., Rush, T., Ciske, J., Lobner, D. (2010). "Selective death of cholinergic neurons induced by beta-methylamino-L-alanine." *Neuroreport.*, 21(1), 55-58.
- Malessa, S., Leigh, P. N., Bertel, O., Sluga, E., Hornykiewicz, O. (1991). "Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord." *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry*, 54(11), 984-988.
- Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H., Hasegawa, M. (2009). "Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43." *Hum. Mol. Genet.*, 18(18), 3353-3364.
- Perry, T. L., Hansen, S., Jones, K. (1987). "Brain glutamate deficiency in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology*, 37(12), 1845-1848.
- Robberecht, W., Philips, T. (2013). "The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis." *Nat. Rev. Neurosci.*, 14(4), 248-264.
- Wijesekera, L. C., Leigh, P. N. (2009). "Amyotrophic lateral sclerosis." *Orphanet. J. Rare. Dis.*, 4:3, 3.

ABSTRACT:**Introduction:**

The β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a non-protein amino acid, highly neurotoxic, produced by most of cyanobacteria (Cox *et al.*, 2005; Banack *et al.*, 2007) and by diatoms (Jiang *et al.*, 2014). These organisms are widely distributed, being found in a large variety of environments throughout the world. Therefore, the L-BMAA has been detected in a large number of aquatic and terrestrial ecosystems and there are considerable evidences of its bioaccumulation in food webs. Consequently, humans can be exposed to this neurotoxin by eating contaminated food, by drinking water and recreational waters and even by inhalation.

It has been demonstrated that L-BMAA can be misincorporated into proteins in place of L-serine (Dunlop *et al.*, 2013), so that a neurotoxic reservoir, which is slowly released through the protein metabolism, is created. In addition, this amino acid crosses both the blood-brain barrier and the placental barrier and can be transferred to infants through breast milk, so that exposure can be started at a young age affecting the normal development of the central nervous system.

Regarding its pathophysiological mechanisms, it is known that L-BMAA reacts with carbon dioxide (CO₂) under physiological conditions to form a carbamylated adduct, the β -(N-carboxy-N-methyl)-amino-L-alanine (BMAA- β -NCO₂) which has high structural similarity to glutamate. Therefore, it has been proposed as the main responsible agent for the L-BMAA excitotoxic activity. This carbamylated adduct acts on glutamate receptors NMDA, AMPA and metabotropic glutamate receptors (mGluRs). Furthermore, it has been suggested that neurons different susceptibility to the effects of this amino acid may depend on the glutamate receptor subtypes that they express (Liu *et al.*, 2010).

On the other hand, L-BMAA can act over the xc⁻ system, both by inhibiting the cystine uptake and increasing the glutamate release, which contribute to neuronal death.

ALS is a neurodegenerative disease characterized by progressive muscle paralysis which reflects degeneration of motor neurons in the primary motor cortex, the corticospinal tracts, the brain stem and the spinal cord (Wijesekera and Leigh, 2009). Most ALS cases are sporadic, but about 5-10% of the cases are familial.

A series of anomalous events undergo in motoneurons, such as deregulation of cellular protein homeostasis, alteration of the autophagy process, formation of protein aggregates, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction, formation of aberrant proteins, axonal transport dysfunction, cytoskeleton disassembly and synaptic failure (Robberecht and Philips, 2013). As in other neurodegenerative diseases, it seems that neuronal degeneration in ALS is a complex interplay between multiple pathogenic cellular mechanisms that don't have to be mutually exclusive.

Neuronal impairment in ALS leads to alterations in neurotransmission systems, reflected in a phenomenon of neuronal hyperexcitability. In addition to this phenomenon, changes in neurotransmitter levels in ALS patients have been extensively studied, detecting altered levels of several neurotransmitters such as glutamate, GABA and taurine (Perry *et al.*, 1987; Malessa *et al.*, 1991).

Regarding the exploration of the molecular mechanisms of this disease, lately two proteins have become relevant. GSK3 is a kinase widely implicated in numerous neuronal processes and changes in its expression levels have been associated with several neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. On the other hand, TDP-43 is the main component of the ubiquitin-positive inclusions found in the brains of ALS patients (Nonaka *et al.*, 2009) and is one of the few disease biomarkers.

In spite of both the numerous studies on the toxicity of L-BMAA *in vivo* and the growing evidence of their involvement in the development of neurodegenerative diseases, never before an animal model of sporadic ALS by the administration of this neurotoxin has been described.

Objectives:

The neurotoxic amino acid L-BMAA has been proposed as one of the main causative agents for sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) appearance. Nowadays, there is not a specific and validated model for the study of this neurodegenerative disease. Therefore, the general objective of the present doctoral thesis is the development of a sporadic ALS *in vivo* model in rats by means of L-BMAA administration.

Results and discussion:

In order to obtain neurological effects that mimic those presented in ALS, the most suitable treatment with L-BMAA was selected: 21 days old rats (at weaning time), with i.p. doses between 200-300 mg/kg/daily for 5 consecutive days. These effects evolve in a fast initial phase, within first 3 months after treatment, followed by a more stable phase in which symptoms are developed progressively.

The selected treatment with L-BMAA does not alter the normal physical development of the animals and, although it affects the liver and kidney, the main detoxifying organs of the organism, increasing oxidative stress, does not compromise their functioning. Thus, the deleterious effects observed are not due to other factors outside the central nervous system, validating this model for the study of the central effects of L-BMAA.

Animals treated with L-BMAA present deficient coordination and motor control resembling those that present ALS patients. Motor effects observed may be due to a loss of control from the central nervous system, which is reflected in various signs of neurodegeneration found:

- a) Selective thinning of the motor cortex that would entail a loss of nervous parenchyma in this area.
- b) Enlarged ventricles which are associated with activation of the immune system and the commitment of the BBB.
- c) Decrease in muscle volume that may reflect atrophy of this tissue due to the loss of innervation from the spinal cord.

- d) Marked hyperintensity on magnetic resonance imaging in certain bulbar nuclei involved in swallowing.
- e) The alteration of N-acetylaspartate (NAA) and related ratios, i.e. N-acetylaspartate/creatine (NAA/Cr), N-acetylaspartate/choline (NAA/Cho) and NAA/Cr+Cho, as indicators of neurodegenerative processes.

The neurodegeneration observed by L-BMAA treatment may be due to damage caused in the cell organelles, such as those involved in the secretory pathway, that is, the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. These damages are caused by the accumulation of misfolded proteins, reflected in the accumulation of TDP-43. Furthermore, damage is also seen in the mitochondria, possibly because of the fact that the excitotoxic effects of L-BMAA cause an increase of reactive oxygen species which damage this organelle.

The abovementioned effects of L-BMAA on organelles trigger autophagic processes, indicated by increased LC3 and P-mTOR. Finally, prolonged neuronal damage results in cell death by apoptosis, indicated by the presence of activated caspase-3 in the lumbar spinal cord.

On the other hand, rats treated with L-BMAA exhibit other features related ALS, such as altered neurotransmitter levels involving long term damage on the glutamatergic and GABAergic systems. Furthermore, a transient alteration in taurine levels, which could be related to a defense system of the central nervous system against excitotoxicity caused by L-BMAA, also appears.

In vivo treatment with L-BMAA also affects two key markers of neurodegenerative diseases: GSK3 and TDP-43. The increased levels of total and phosphorylated GSK3, can play a key role in the signaling cascades leading to neuronal degeneration. Furthermore, accumulation of TDP-43 is one of the main features of ALS and may have great relevance in the course of the disease.

Finally, we wanted to verify the utility of this model for testing molecules for the treatment of sporadic ALS. This way, positive results were obtained by treatment with GSK3 inhibitor VP2.51 from day 1 post-treatment, achieving the recovery of neurologic symptoms in animals treated with L-BMAA and preventing the activation of autophagic

processes that, presumably, are a step prior to neurodegeneration. The results obtained with this therapeutic molecule indicate the suitability of this model for conducting such tests.

Conclusions:

This study reveals that rats treated with L-BMAA have a number of features that mimic the pathophysiological features of ALS. In this model of sporadic ALS, the progressive development of symptoms and the fact that the treatment does not have lethal consequences in the long period of time studied for these animals, unlike what happens in genetic models of familial ALS, make feasible in-depth study of the various disease stages and allows the testing of molecules that can treat or reverse the symptoms.

Bibliography:

- Banack, S. A., Johnson, H. E., Cheng, R., Cox, P. A. (2007). "Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium." *Mar. Drugs.*, 5(4), 180-196.
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., Bergman, B. (2005). "Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(14), 5074-5078.
- Dunlop, R. A., Cox, P. A., Banack, S. A., Rodgers, K. J. (2013). "The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation." *PLoS. One.*, 8(9), e75376.
- Jiang, L., Eriksson, J., Lage, S., Jonasson, S., Shams, S., Mehine, M., Ilag, L. L., Rasmussen, U. (2014). "Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments." *PLoS. One.*, 9(1), e84578.
- Liu, X. Q., Rush, T., Ciske, J., Lobner, D. (2010). "Selective death of cholinergic neurons induced by beta-methylamino-L-alanine." *Neuroreport.*, 21(1), 55-58.
- Malessa, S., Leigh, P. N., Bertel, O., Sluga, E., Hornykiewicz, O. (1991). "Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord." *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry*, 54(11), 984-988.

- Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H., Hasegawa, M. (2009). "Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43." *Hum. Mol. Genet.*, 18(18), 3353-3364.
- Perry, T. L., Hansen, S., Jones, K. (1987). "Brain glutamate deficiency in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology*, 37(12), 1845-1848.
- Robberecht, W., Philips, T. (2013). "The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis." *Nat. Rev. Neurosci.*, 14(4), 248-264.
- Wijesekera, L. C., Leigh, P. N. (2009). "Amyotrophic lateral sclerosis." *Orphanet. J. Rare. Dis.*, 4:3, 3.

ABREVIATURAS:	3
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA)	9
1.1.1.Exposición al L-BMAA	12
1.1.2.Métodos de detección	14
1.1.3.Absorción y distribución del L-BMAA	16
1.1.4.Metabolismo del L-BMAA	18
1.1.5.Efectos neurotóxicos del L-BMAA	20
1.1.5.1.Efecto del L-BMAA sobre los receptores de glutamato	21
1.1.5.2.Efecto del L-BMAA sobre el antiporte cistina/glutamato (sistema xc-)	25
1.2. Esclerosis Lateral Amiotrófica	27
1.2.1.Sintomatología	29
1.2.2.Tipos de ELA	30
1.2.2.1.ELA familiar	30
1.2.2.2.ELA esporádica	31
1.2.3.Patogénesis de la degeneración de motoneuronas en la ELA	31
1.2.3.1.Factores genéticos	32
1.2.3.2.Excitotoxicidad	33
1.2.3.3.Déficits en factores neurotróficos	33
1.2.3.4.Agregación proteica	34
1.2.3.5.Estrés oxidativo	35
1.2.3.6.Disfunción mitocondrial	37
1.2.3.7.Alteración de la vía secretora en la ELA	39
1.2.3.8.Alteración de la autofagia en la ELA	42
1.2.3.9.Alteración de la neurotransmisión en la ELA	44
1.3. Alteración de marcadores de neurodegeneración	48
1.3.1.Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)	48
1.3.2.Proteína de unión al DNA TAR-43 (TDP-43)	50
1.4. Modelos animales de ELA	51
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. Animales de experimentación	63
3.2. Tratamiento con L-BMAA	63
3.3. Control ponderal	64
3.4. Evaluación Neurológica	64
3.5. Análisis de los efectos del L-BMAA sobre el estrés oxidativo en el hígado y el riñón	67
3.5.1.Análisis del perfil hepático	67
3.5.2.Estrés oxidativo	69

3.6.	Pruebas Funcionales	71
3.6.1.	RotaRod	71
3.6.2.	Test de huellas.....	71
3.7.	Imagen de Resonancia Magnética (IRM).....	72
3.7.1.	IRM in vivo:.....	72
3.7.2.	IRM ex vivo:	74
3.8.	Espectroscopía por resonancia magnética.....	75
3.8.1.	<i>In vivo</i> : Espectroscopía localizada.....	75
3.8.2.	<i>Ex vivo</i> : espectroscopia de alta resolución – HR-MAS (<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>).	76
3.8.2.1.	Tejidos:	77
3.8.2.2.	Sueros:.....	77
3.9.	Valoración de proteínas por Western-Blot:	78
3.9.1.	Aislamiento de proteínas:	78
3.9.1.1.	GSK3 β :	78
3.9.1.2.	TDP-43:.....	79
3.9.1.3.	LC3B y P-mTOR:.....	79
3.9.2.	Electroforesis y electrotransferencia:	80
3.9.3.	Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas:	81
3.10.	Inmunofluorescencia por microscopía confocal	81
3.11.	Microscopía electrónica.	83
3.11.1.	Microscopía electrónica convencional:	83
3.11.2.	Inmunohistoquímica por microscopía electrónica:.....	84
3.12.	Ensayo de protección con un inhibidor de GSK3 β : VP2.51.	85
3.13.	Anticuerpos utilizados en las distintas técnicas.	87
3.14.	Análisis estadísticos.	88
4.	RESULTADOS	93
4.1.	Control ponderal.....	93
4.2.	Dosis de L-BMAA y evaluación neurológica	94
4.3.	Detección de L-BMAA en suero	98
4.4.	Análisis del estado de los sistemas de detoxificación sistémicos	99
4.4.1.	Análisis del perfil hepático	99
4.4.2.	Estrés oxidativo en hígado y riñón	100
4.5.	Pruebas Funcionales:	104
4.5.1.	RotaRod	104
4.5.1.1.	Velocidad constante:	104
4.5.1.2.	Aceleración:.....	105
4.5.2.	Test de huellas.....	105
4.6.	Análisis por Imagen de Resonancia Magnética (IRM)	106
4.6.1.	Volumen muscular de las extremidades traseras.....	106
4.6.2.	Volumen de la corteza cerebral	108

4.6.3. Volumen de los ventrículos laterales	109
4.6.4. Alteración de los núcleos bulbares	111
4.7. Perfil metabólico del tejido nervioso	112
4.8. Alteraciones ultraestructurales	114
4.9. Análisis de la muerte celular por apoptosis	124
4.10. Alteraciones neuroquímicas en la corteza motora	125
4.10.1. Alteraciones neuroquímicas a corto plazo	125
4.10.2. Alteraciones neuroquímicas a largo plazo	127
4.11. Alteraciones de GSK3 β	129
4.12. Alteraciones de TDP-43	133
4.13. Utilización de los animales tratados con L-BMAA en el ensayo de una molécula potencialmente terapéutica, VP2.51	138
4.13.1. Control ponderal	138
4.13.2. Evaluación neurológica.....	139
4.13.3. Protección de la autofagia por VP2.51	141
5. DISCUSIÓN	149
5.1. El inicio del tratamiento con L-BMAA se lleva a cabo en el día 21 postnatal por vía intraperitoneal	149
5.2. El tratamiento con L-BMAA no afecta a la evolución ponderal de los animales	151
5.3. El daño neurológico buscado se consigue administrando una dosis de 300 mg/kg/día, durante 5 días consecutivos desde el momento del destete	152
5.4. Un día después de finalizar el tratamiento no existen cantidades detectables de L-BMAA en la sangre	154
5.5. El L-BMAA, a la dosis utilizada, produce daño oxidativo en hígado y riñón, pero no compromete la vida del animal.....	155
5.6. Las ratas tratadas con L-BMAA presentan alteraciones semejantes a las descritas en la ELA.....	160
5.6.1. Los animales presentan alteraciones en la coordinación motora ...	160
5.6.2. Los análisis morfométricos por IRM indican alteraciones tanto en el músculo de las patas traseras de las ratas como en corteza cerebral y ventrículos	161
5.6.3. Los análisis de hiperintensidad por IRM indican alteraciones en núcleos bulbares implicados en la deglución	165
5.6.4. El análisis de metabolitos por HR-MAS muestra la presencia de procesos neurodegenerativos	167
5.6.5. El análisis ultraestructural en corteza motora y médula espinal lumbar afecta a las motoneuronas causando estrés en el R.E., disfunción de la vía secretora, alteraciones mitocondriales, incremento de la autofagia y presencia de abundantes oligodendrocitos con núcleos típicamente apoptóticos	169

5.6.6.El análisis de caspasa-3 indica un incremento de neuronas apoptóticas en médula espinal y corteza motora	175
5.6.7.Los animales tratados con L-BMAA presentan alteraciones en los sistemas de neurotransmisión.....	180
5.6.8.Los análisis de GSK3 β indican un significativo aumento de este marcador de neurodegeneración	186
5.6.9.Los análisis de TDP-43 indican la presencia de formas aberrantes y agregados de este biomarcador de ELA.....	189
5.7. Los animales tratados con L-BMAA pueden constituir un modelo experimental de ELA esporádica.....	192
6. CONCLUSIONES	199
7. BIBLIOGRAFÍA.....	205

ABREVIATURAS:

2,4-DAB: ácido 2,4-diaminobutírico

ACP: fosfatasa ácida

AD: enfermedad de Alzheimer

AG: aparato de Golgi

ALP: fosfatasa alcalina

ALS-PDC: complejo esclerosis lateral amiotrófica-Parkinson demencia

ALT: alanina aminotransferasa

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ASK1: kinasa reguladora de la señal de apoptosis

AST: aspartato aminotransferasa

ATP: adenosín trifosfato

BCL-2: *B-cell CLL/lymphoma 2*

b.e.: barra de escala

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BGS: *brain growth spurt*

BHE: barrera hematoencefálica

BMAA- α -NCO₂: α -N-carboxi- β -N-metilamino-L-alanina

BMAA- β -NCO₂: β -(N-carboxi-N-metil)-amino-L-alanina

BSA: albúmina de suero bobino

CDKs: kinasas dependientes de ciclinas

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato

CHESS: *Chemically sHift Selective Saturation*

Cho: colina

CHOP: *C/EBP homologous protein*

CK-1 δ : caseína kinasa-1 δ

Cr: creatina

CTNF: factor neurotrófico ciliar

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DG: día de gestación

DMSO: dimetil sulfoxido

DPN: día posnatal

DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico

EAAT: transportador de aminoácidos excitatorios

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EM: Esclerosis Múltiple

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

ERAD: mecanismo de degradación asociada al RE

FCTs: fragmentos C-terminales

FID: *free induction decay*

FOV: campo de visión

FSE: eco de espín rápido

FTLD: demencia fronto-temporal lobar

GABA: ácido γ -aminobutírico

GC: cromatografía gaseosa

GDNF: factor neurotrófico derivado de célula glial

GHD: glutamato dehidrogenasa

GlyR: receptor postsináptico de glicina

GPx: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión reducido

GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3

GSSG: glutatión oxidado

HD: enfermedad de Huntington

HILIC: *Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography*

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HR-MAS: ^1H RMN *High Resolution Magic Angle Spinning*

HSF1: factor de shock térmico 1

i.c.v.: intra-cerebro ventricular

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenosa

IC₅₀: concentración inhibitoria 50

IF-MC: inmunofluorescencia por microscopía confocal

IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1

IHQ-ME: inmunohistoquímica por microscopía electrónica
IMPasas: inositolmonofosfatasas
IP3: inositol trifosfato
IP3: inositol trifosfato
IQM-CSIC: Instituto de Química Médica del CSIC
IRM: Imagen de Resonancia Magnética
iTauR: receptores ionotrópicos de taurina
LAT: transportador de aminoácidos tipo-L
L-BMAA: β -N-metilamino-L-alanina
LC: cromatografía líquida
LC3: proteína asociada a microtúbulos cadena ligera 3
LC₅₀: concentración letal 50
LCR: líquido cefalorraquídeo
LS: tampón *low salt*
MDA: malondialdehído
mGluR: receptor metabotrópico de glutamato
MS: espectrometría de masas
mTauR: receptores metabotrópicos de taurina
mTOR: *mammalian target of rapamycin*
NA: número de adquisiciones
NAA: N-acetilaspártato
NBQX: *2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (F) quinoxaline*
NeuN: antígeno neuronal nuclear
NMDA: N-metil-D-aspartato
OVS: *Outer Volume Suppression*
PAMPA: *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*
PBS: tampón fosfato salino
PE: fosfatidiletanolamina
PD: enfermedad de Parkinson
PI3K: fosfatidilinositol 3-kinasa
PLC: fosfolipasa C
p-NPP: p-nitrofenil fosfato
PRESS: *Point-Resolved Spectroscopy Sequence*

PT: postratamiento

RARE: *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*

RE: retículo endoplásmico

RE: retículo endoplásmico

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROS: especies reactivas de oxígeno

RRM: Motivo de reconocimiento de ARN

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*

s.c.: subcutánea

SD: desviación estándar

SEM: error estándar de la media

SEN: secuencia de exportación nuclear

SLN: secuencia de localización nuclear

SNC: sistema nervioso central

SOD1: superóxido dismutasa Cobre-Zinc

T2WI: imágenes potenciadas en T2

TauT: transportador de taurina

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TDP-43: proteína de unión al ADN TAR-43

TE: tiempo de eco

TR: tiempo de recepción

UPR: respuesta a proteínas mal-plegadas

UPS: sistema ubiquitina-proteasoma

V3: rama maxilar superior del nervio trigémino

VAPB: VAMP (proteína de membrana asociada a vesícula)-proteína asociada B

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VGCC: canales de calcio dependientes de voltaje

WB: western-blot

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA)

El β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) es un aminoácido no proteico y no lipofílico, altamente neurotóxico producido por la mayoría de las cianobacterias (Cox *et al.*, 2005; Banack *et al.*, 2007) y por diatomeas (Jiang *et al.*, 2014). Este aminoácido ha sido relacionado con la aparición esporádica de varias enfermedades neurodegenerativas como son el complejo esclerosis lateral amiotrófica-Parkinson demencia (ALS-PDC de las siglas en inglés), enfermedad de Alzheimer (AD) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Holtcamp, 2012), por lo que el estudio de sus mecanismos de neurotoxicidad ha cobrado gran relevancia en los últimos años.

La hipótesis de que el L-BMAA puede ser el causante de enfermedades neurodegenerativas ha pasado por distintas fases desde mediados del siglo XX, según iban apareciendo nuevas evidencias sobre su relación con dichas enfermedades y sobre sus mecanismos de acción.

Los primeros estudios sobre esta molécula se realizaron en relación con la alta incidencia de ALS-PDC en Guam. Cuando Estados Unidos recuperó las Islas Marianas en 1944 de Japón, se encontró una incidencia extremadamente alta de ALS-PDC en Guam, que en 1954 fue estimada que era de 50-100 veces superior a la tasa mundial entre la población local chamorro (Arnold *et al.*, 1953; Kurtland *et al.*, 1954 a, b; Mulder y Kurtland, 1987). Una vez descartada una correlación genética, la atención se volvió hacia factores ambientales y culturales (Kurtland *et al.*, 1954 a, b), por lo que los investigadores se centraron en el consumo de harina de semillas de *Cycas* (*Cycas micronesica* Hill) por parte de los chamorros. Borenstein *et al.* (2007) llevaron a cabo un estudio poblacional de los chamorros que demostraba que el consumo de *Cycas* presentaba el mayor riesgo asociado de desarrollar ALS-PDC.

El estudio de las semillas de *Cycas* en busca de posibles tóxicos dio lugar al descubrimiento en 1967 del L-BMAA (Vega y Bell, 1967; Vega *et al.*, 1968). En ese momento, se creyó que la conexión del L-BMAA con el ALS-PDC sufrida por los chamorros estaba sólo relacionada con el consumo de harina hecha con semillas de

Cycas micronesica (Vega y Bell, 1967; Vega *et al.*, 1968, Polsky *et al.*, 1972; Spencer *et al.*, 1991; Murch *et al.*, 2004; Ince y Codd, 2005). El hecho de que el procedimiento de procesamiento de la harina de *Cycas* por los chamorros elimina casi todo el L-BMAA (Duncan *et al.*, 1990), combinado con la inexistencia de una conexión etiológica clara entre el consumo de *Cycas* y los otros dos focos de ALS-PDC, en el oeste de Papua y en la península de Kii en Japón, condujo a que el L-BMAA fuera descartado como la posible causa de la enfermedad neurodegenerativa entre los chamorros (Ince y Codd, 2005).

El interés en el L-BMAA se reavivó en 2002, cuando se hipotetizó que este aminoácido se podía acumular dentro de los animales que comían *Cycas* (Cox y Sacks, 2002). Finalmente, Cox *et al.* (2003) describieron que el L-BMAA es producido por cianobacterias del género *Nostoc* que viven como simbiontes dentro de unas raíces especializadas de forma coralina de *Cycas*, produciéndose posteriormente la biomagnificación (la acumulación de moléculas bioactivas, potencialmente deletéreas, a través de niveles tróficos más elevados de una cadena trófica) de este neurotóxico a través del ecosistema de Guam. Mientras que las cianobacterias de vida libre producen 0,3 µg/g de L-BMAA, como simbiontes en las raíces de *Cycas* producen de 2 a 37 µg/g, acumulándose posteriormente en las semillas de *Cycas micronesica*. La biomagnificación del L-BMAA a través del ecosistema de Guam se ajusta al típico triángulo de concentraciones crecientes de compuestos tóxicos según se asciende en la cadena trófica: los zorros voladores (*Pteropus mariannus*) se alimentan de las semillas de *Cycas* y a su vez los chamorros se alimentan tanto de las semillas de *Cycas* como de los zorros voladores. Como resultado de la biomagnificación, se ha encontrado una concentración media de 6 µg/g de L-BMAA en muestras de córtex frontal de chamorros que murieron de ALS-PDC. Además, también se ha encontrado una concentración media de 6,6 µg/g de L-BMAA en el córtex frontal pacientes canadienses que murieron de AD, lo cual sugiere que este neurotóxico se acumula a través de otros ecosistemas marinos y terrestres (Cox *et al.*, 2003).

A pesar de que se había descrito el proceso de biomagnificación, se desconocía el mecanismo por el cual el L-BMAA se bioacumulaba dado que no es un aminoácido lipofílico. Siguiendo esta línea de investigación, Murch *et al.* (2004) demostraron que el L-BMAA se incorpora en proteínas. Tras la separación del L-BMAA de las proteínas mediante hidrólisis ácida, se demostró que la cantidad de L-BMAA que se acumula a través de la cadena trófica en el ecosistema de Guam, es mucho mayor que la que se estimó inicialmente teniendo en cuenta sólo el aminoácido libre (figura 1) (Murch *et al.*, 2004). Recientemente, Dunlop *et al.* (2013) han demostrado que el L-BMAA puede incorporarse erróneamente a las proteínas humanas en lugar de la L-serina. Por lo tanto, en las personas o los animales expuestos al L-BMAA existe un reservorio interno del neurotóxico, en el tejido cerebral u otros tejidos, que se libera lentamente, durante años o décadas después de su consumo, mediante la hidrólisis de proteínas y que puede explicar el largo tiempo de latencia que presenta el ALS-PDC.

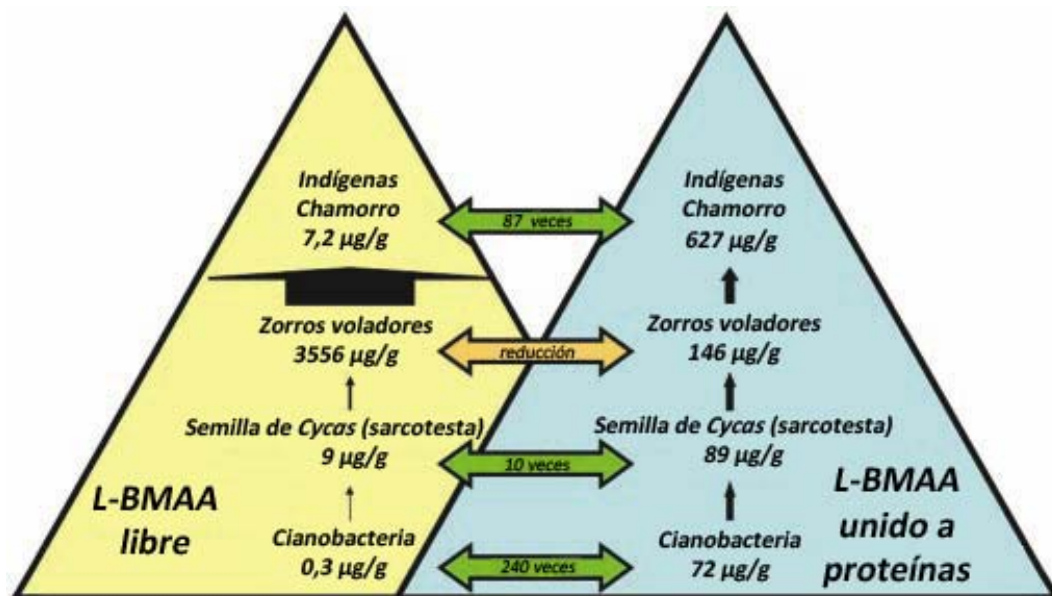


Figura 1: Biomagnificación del L-BMAA libre y unido a proteínas en el ecosistema de Guam. Adaptado de Murch *et al.* (2004).

Finalmente, en 2005 se descubrió que el L-BMAA es producido por la mayoría de las cianobacterias, tanto de vida libre, acuáticas y terrestres, como simbióticas (Cox *et al.*, 2005) y, recientemente, Jiang *et al.* (2014) han encontrado que este neurotóxico es producido por varias especies de diatomeas. Estos hechos sugieren que la exposición a este aminoácido puede ser mucho más amplia de lo que se pensó en un principio, por

lo que podría estar relacionado con la aparición de enfermedades neurodegenerativas esporádicas a lo largo de todo el mundo.

Como señala Rodgers (2014) en una importante revisión sobre este tema, la entrada de aminoácidos no proteicos en la cadena trófica humana y su incorporación dentro de las proteínas pueden contribuir significativamente al daño neurodegenerativo, por lo que han cobrado gran relevancia en los últimos tiempos.

El hallazgo de L-BMAA en pacientes de AD y ALS, además de haberse encontrado en bajas concentraciones en un paciente que murió de enfermedad de Huntington (HD), ha hecho que algunos autores propongan la hipótesis de que la acumulación de L-BMAA es un factor en el desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas (Pablo *et al.*, 2009). Por lo tanto, puede existir una interacción gen/medio ambiente, con el L-BMAA desencadenando la neurodegeneración en individuos genéticamente susceptibles (Rodgers y Dunlop, 2011).

1.1.1. Exposición al L-BMAA

Las cianobacterias y las diatomeas son organismos cosmopolitas que se encuentran como organismos de vida libre o de forma simbiótica en ambientes acuáticos y terrestres a lo largo de todo el mundo (Karlsson *et al.*, 2014). Las cianobacterias se encuentran entre los grupos más antiguos de la Tierra ya que surgieron hace 3 billones de años (Ince y Codd, 2005). Son responsables, entre otros, de la fijación del nitrógeno atmosférico en amonio, nitritos o nitratos, los cuales pueden ser absorbidos e incorporados a proteínas y ácidos nucleicos por las plantas (Papapetropoulos, 2007). Son colonizadores primarios, pueden vivir en ambientes extremos (Ince y Codd, 2005), por lo que son organismos ampliamente distribuidos, encontrándose en ambientes acuáticos o terrestres a lo largo de todo el mundo (Karlsson *et al.*, 2009 b). Además son el mayor componente de las comunidades de fitoplancton en la superficie de aguas de los océanos y de agua dulce en lagos y ríos (Brand, 2009).

Se conocen más de 100 productos tóxicos de cianobacterias, incluyendo potentes hepatotoxinas, citotoxinas y neurotoxinas (Codd *et al.*, 2005). Estas cianotoxinas representan un importante peligro para la salud humana mediante múltiples vías de

exposición: a través del agua de bebida, de la exposición a aguas recreacionales y por la ingesta de vegetales regados por aspersión (Codd *et al.*, 1999, 2005) y de alimentos procedentes del mar (Falconer *et al.*, 1992; Zimba *et al.*, 2001).

Dada la importancia que ha cobrado el L-BMAA en los últimos años, varios grupos de investigación se han centrado en su detección en ecosistemas acuáticos a lo largo de todo el mundo, encontrando que sus efectos potencialmente peligrosos sobre la salud humana podrían estar mucho más extendidos de lo que se pensaba inicialmente (Metcalf y Codd, 2009).

El L-BMAA ha sido detectado en diversos ecosistemas acuáticos a lo largo de todo el mundo (Esterhuizen y Downing, 2008; Faassen *et al.*, 2009; Craighead *et al.*, 2009; Cervantes Cianca *et al.*, 2012; Al-Sammak *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2014), así como en aguas utilizadas en las actividades humanas, es decir, recreacionales, destinadas para el tratamiento para el agua de bebida, de riego y de pesca (Metcalf *et al.*, 2008, 2009). La presencia de L-BMAA en estos ambientes ha sido relacionada con una alta incidencia de ELA en estas zonas (Caller *et al.*, 2009, 2012) e incluso con la aparición de enfermedades en animales salvajes, como la Mielinopatía Vacuolar Aviar (Bidigare *et al.*, 2009).

Por otra parte, también se ha encontrado L-BMAA en moluscos y pescado para el consumo humano (Brand *et al.*, 2010; Jonasson *et al.*, 2010; Mondo *et al.*, 2012; Downing *et al.*, 2014) y se ha confirmado la biomagnificación de este neurotóxico a lo largo de cadenas tróficas acuáticas (Mondo *et al.*, 2012; Al-Sammak *et al.*, 2014).

Las consecuencias de las toxinas de las cianobacterias en la salud humana, las industrias basadas en el agua, las aguas recreativas y la vida salvaje, son de gran preocupación dado que la eutrofización y el aumento de la temperatura global conllevan incrementos en la extensión geográfica, la densidad de población y la duración de los florecimientos de cianobacterias tanto en agua dulce como salada (Cox *et al.*, 2005).

Además del caso de los indígenas Chamorro en Guam, existen otras subpoblaciones en las que se ha encontrado una alta prevalencia de ELA en comparación con la población normal, concretamente: algunos grupos de deportistas, como jugadores de fútbol italianos (Chiò *et al.*, 2005) y jugadores de fútbol americano (Abel, 2007), y veteranos de la Guerra del Golfo que estuvieron en el desierto de Qatar (Cox *et al.*, 2009). El factor común a todos estos casos podría ser la exposición a toxinas ambientales presentes en los campos de fútbol y el polvo del desierto. Cox *et al.* (2009) estudiaron ampliamente el caso de los veteranos de la Guerra del Golfo. Descubrieron que existen grandes acumulaciones de cianobacterias que producen L-BMAA formando cortezas y alfombras sobre la arena del desierto de Qatar. Este estudio sugiere que la actividad militar sobre este terreno pudo levantar grandes cantidades de polvo, por lo que el personal militar desplazado estuvo expuesto al L-BMAA y otras cianotoxinas por inhalación (Cox *et al.*, 2009). En este sentido, recientemente Stommel *et al.* (2013) han hipotetizado que algunos casos de ELA podrían estar relacionados con la exposición crónica a la aerosolización de L-BMAA derivado de cianobacterias desde torres de refrigeración, lo que podría explicar la observación de parejas conyugales con ELA.

Dados todos estos casos de exposición al L-BMAA, Goto *et al.* (2012) sugirieron que la exposición crónica a pequeñas cantidades de este neurotóxico puede representar al menos un factor de riesgo en la inducción de enfermedades neurodegenerativas como la ELA, la enfermedad de Parkinson (PD) y la AD.

1.1.2. Métodos de detección

Uno de los puntos más controvertidos de la hipótesis del L-BMAA es la gran variabilidad en las concentraciones detectadas del tóxico, tanto en muestras de cianobacterias como en muestras de tejidos vegetales, animales y de pacientes de varias enfermedades neurodegenerativas.

Como se describe arriba, se ha detectado L-BMAA en muestras de pacientes con ELA, AD y PD (Cox *et al.*, 2003; Pablo *et al.*, 2009). Sin embargo, otros investigadores fallaron en la detección de L-BMAA en tejidos de enfermos de ALS-PDC Y AD (Montine *et al.*, 2005; Snyder *et al.*, 2009). Así mismo, existe cierta controversia respecto a las

bajas concentraciones detectadas en la harina de *Cycas* por Duncan *et al.* (1990), argumento por el que se rechazó al L-BMAA como posible causante de estas enfermedades en un principio, y las altas concentraciones detectadas posteriormente por Cheng y Banack (2009), que encontraron niveles significativos de L-BMAA asociado a proteínas en la harina de *Cycas* lavada.

Respecto a las muestras de cianobacterias tomadas a lo largo de todo el mundo, los distintos ensayos han puesto de relieve que las condiciones de cultivo en las que crecen dichas cianobacterias pueden variar significativamente las concentraciones de L-BMAA detectadas. La variabilidad en los resultados obtenidos en distintas muestras, han provocado que en los últimos años se hayan desarrollado múltiples protocolos de alta sensibilidad para mejorar la detección y aclarar la controversia sobre el papel del L-BMAA en el desarrollo de estas enfermedades.

Se han utilizado distintos sistemas analíticos para la detección del L-BMAA, principalmente separación por cromatografía líquida (LC) o cromatografía gaseosa (GC) con detección por espectrometría de masas (MS) (Banack *et al.*, 2010 a). Pero se han ido desarrollando protocolos más avanzados, con los que el L-BMAA se ha detectado en muestras de cianobacterias, usando el analizador de aminoácidos Hitachi (Banack *et al.*, 2007; Cox *et al.*, 2009; Craighead *et al.*, 2009) o en LC-MS usando cromatografía líquida de fase reversa (Bidigare *et al.*, 2009) y con HILIC LC-MS/MS (Faassen *et al.*, 2009). Actualmente, varios grupos de investigación siguen trabajando en la validación de protocolos lo suficientemente precisos para cuantificar con fiabilidad en L-BMAA en muestras biológicas (Baptista *et al.*, 2011; Al-Sammak *et al.*, 2013; Combes *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013).

Es importante señalar que existen varios isómeros estructurales del L-BMAA, de los cuales el ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB) es el que tiene más relevancia dado que es un aminoácido no proteico (Banack *et al.*, 2010 a), que ha sido aislado de varias partes de *C. micronesica* (Banack y Cox, 2003). Puesto que el 2,4-DAB y otros isómeros tienen un peso molecular similar al L-BMAA y pueden coexistir en las mismas muestras biológicas, se han desarrollado técnicas específicas para diferenciar y separar estos

aminoácidos (Kushnir y Bergquist, 2009; Banack *et al.*, 2010 a; Spácil *et al.*, 2010; Al-Sammak *et al.*, 2013).

Para resolver las diferencias entre los distintos grupos de investigación y determinar cuál es el riesgo que posee el L-BMAA para la salud humana, se debe alcanzar un consenso en la comunidad científica sobre el nexo que existe entre el L-BMAA y la aparición de algunas enfermedades neurodegenerativas.

1.1.3. Absorción y distribución del L-BMAA

Duncan *et al.* (1991) llevaron a cabo uno de los primeros estudios sobre la farmacocinética del L-BMAA, su biodisponibilidad oral y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) a este compuesto en rata. Después de una sola inyección intravenosa (i.v.), el L-BMAA es aclarado del plasma en una fase de distribución rápida seguida por una fase de eliminación más lenta. Los niveles de L-BMAA en el cerebro alcanzan su pico 8 horas después de la inyección y, posteriormente van disminuyendo de forma similar que en el plasma. La entrada al cerebro se limita por una baja permeabilidad de la BHE, produciéndose un flujo unidireccional de entrada (Duncan *et al.*, 1991). Resultados similares han sido obtenidos recientemente en ratones (Xie *et al.*, 2013).

Más tarde, Smith *et al.* (1992) comprobaron que el flujo de L-BMAA hacia el cerebro a través de la BHE es saturable, que la entrada del aminoácido es independiente de sodio y es impedida por un exceso de L-leucina, pero no por L-lisina, L-glutamato o ácido metilaminoisobutírico. Además, el L-BMAA inhibe competitivamente el flujo de entrada de L-leucina al cerebro, por lo que el transporte debe realizarse a través del transportador de aminoácidos grandes neutros cerebrovascular (Smith *et al.*, 1992).

Llama la atención que más del 50% de los pacientes que sufren ALS-PDC también padezcan retinopatía pigmentaria, una rara enfermedad retinar (Campbell *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1989). Esto se suma a los síntomas parkinsonianos debidos a la degeneración de las neuronas que contienen neuromelanina en la sustancia nigra, creando un vínculo común. Karlsson *et al.* (2009 a) investigaron la distinta absorción de ³H-L-BMAA entre ratones adultos albinos y no-albinos, demostrando una absorción y

retención incrementada *in vivo* en las células que sintetizan melanina. Además, observaron que el L-BMAA se retiene a largo plazo en los tejidos que contienen melanina, como el hígado, además de una alta concentración en neuronas que contienen neuromelanina que se mantiene durante un largo periodo. Este estudio en ratones adultos reveló que no hay una gran absorción de L-BMAA por parte del cerebro y la médula espinal, después de una sola inyección i.v., y que la distribución en el cerebro es homogénea. El estudio autoradiográfico también muestra una absorción aumentada en tejidos con un alto recambio celular o síntesis proteica como la médula ósea, el páncreas exocrino y la mucosa gastrointestinal, así como altos niveles de radiactividad en el hígado y la región cortico-medular del riñón (Karlsson *et al.*, 2009 a).

Dado que el sistema nervioso central (SNC) de fetos y neonatos está en momentos críticos del desarrollo y que en este periodo la BHE puede ser más permeable a los xenobióticos, la exposición prenatal al L-BMAA puede tener efectos negativos en el desarrollo del cerebro. Karlsson *et al.* (2009 b), estudiaron la distribución del L-BMAA en ratones gestantes tras una sola inyección i.v., demostrando que este neurotóxico se transfiere a los fetos a través de la placenta. Mientras que en las hembras inyectadas la distribución es similar a la presentada por los ratones adultos, en los tejidos fetales se produce una absorción pronunciada. La distribución es homogénea en los fetos 30 min después de la inyección, pero a las 3 h se produce una absorción selectiva por parte del SNC que va aumentando hasta el mayor intervalo de supervivencia estudiado (24 h) (Karlsson *et al.*, 2009 b).

Además, puede existir una importante vía de exposición posnatal a través de la leche materna. Andersson *et al.* (2013) demostraron que la secreción en la leche puede ser una importante vía de eliminación de L-BMAA en ratones lactantes y puede constituir una ruta de exposición para las crías lactantes, alcanzando concentraciones más altas en el cerebro de estas últimas que en el de las madres. En este estudio, se sugiere también, mediante estudios de competitividad con otros aminoácidos, que el L-BMAA se transfiere a la leche mediante los transportadores de aminoácidos LAT1 y LAT2 (Andersson *et al.*, 2013)

Por otro lado, una sola inyección subcutánea (s.c.) de L-BMAA en ratones de 10 días de edad demostró que su distribución es distinta en individuos neonatos que en los cerebros de ratones adultos, localizándose selectivamente en áreas específicas del cerebro: el tálamo, el cerebelo, el tronco encefálico, la médula espinal, el estriado y el hipocampo (Karlsson *et al.*, 2009 b). Esta absorción diferencial de L-BMAA podría tener una gran importancia en el desarrollo de estas áreas concretas.

1.1.4. Metabolismo del L-BMAA

Existe poca información acerca del metabolismo del L-BMAA. Se ha observado que un derivado α -N-acetil, posiblemente formado por N-acetilación por acetil-CoA, es excretado por ratas tratadas con L-BMAA (Reece y Nunn, 1989) y que el propio aminoácido es oxidado por la L-aminoácido oxidasa (Hashmi y Anders, 1991).

Duncan *et al.* (1991), en un intento por definir mejor el posible papel del L-BMAA en enfermedades neurodegenerativas, estudiaron la farmacocinética, la biodisponibilidad oral y la permeabilidad de la BHE en la rata, evaluando así la importancia del aminoácido como una neurotoxina ambiental. Los resultados sugirieron que el L-BMAA puede llegar a niveles potencialmente tóxicos en el cerebro ($>250 \mu\text{M}$) después de tratar a ratas con dosis superiores a 100 mg/kg. Sin embargo, estas dosis eran órdenes de magnitud mayores que las disponibles por el uso alimentario o medicinal de las *Cycas*. Esta última afirmación quedó rebatida por las aportaciones de Murch *et al.* (2004), comentadas anteriormente, que demostraron que el L-BMAA se incorpora en proteínas y por tanto, que el L-BMAA que se acumula a través de la cadena trófica en el ecosistema de Guam, es mucho mayor que la que se estimó inicialmente teniendo en cuenta sólo el aminoácido libre.

Además, las investigaciones de Duncan *et al.* (1991) demostraron que no había ningún descenso significativo en la concentración de L-BMAA en experimentos *in vitro*, después de dos horas de incubación con homogenizados de hígado, músculo, riñón y cerebro de rata. Sin embargo, en experimentos *in vivo*, si se encontró que menos del 10% de la dosis de L-BMAA inyectada, aparecía en la orina y las heces de las ratas 7 días después del tratamiento, lo cual sugiere una importante metabolización del aminoácido durante ese periodo. Posteriormente, Mash *et al.* (2008) observaron que

tras la inyección en ratas de L-BMAA con el grupo metilo tritiado, este aminoácido alcanzaba su máximo a las 8 h y permanecía elevado en el cerebro 48 h tras la inyección, mientras que en otros órganos los niveles disminuían rápidamente en el tiempo.

Más tarde, Nunn y Ponnusamy (2009) llevaron a cabo un amplio estudio para conocer mejor el metabolismo y los efectos del L-BMAA en tejidos de rata, utilizando cortes de cerebro y homogeneizados de hígado, riñón y cerebro. Estos autores realizaron además el análisis *in vitro* de la reacción del L-BMAA con piridoxal-5'-fosfato mediante ^1H RMN. Sus resultados pusieron de manifiesto que el L-BMAA reacciona de manera no enzimática con el piridoxal-5'-fosfato, produciéndose la liberación de amonio y metilamina. Mientras que la señal del L-BMAA se debilita tras 24 h de incubación con diferentes tejidos, la de la metilamina se intensifica. Este resultado es congruente con la disminución que obtuvieron en la concentración de taurina, serina y glicina encontrada en los cortes de cerebro incubados con L-BMAA, ya que éste podría estar inhibiendo uno o más de los pasos dependientes de piridoxal-5'-fosfato en la síntesis de estos compuestos. Además, en los homogeneizados de hígado y riñón incubados con éste tóxico también se forma metilamina, probablemente por α , β -eliminación por la serina/treonina deshidratasa, y ácido 2,3-diaminopropiónico, un producto demetilado del L-BMAA que sugiere que éste aminoácido es susceptible a la N-demetilasa, ambas enzimas presentes en estos tejidos. La formación de metilamina en el hígado y el riñón es de especial importancia, ya que la administración crónica de esta sustancia a ratas causa estrés oxidativo.

La metilamina es metabolizada por la amina oxidasa sensible a semicarbacida, enzima presente en el plasma sanguíneo y en la vasculatura (Nunn y Ponnusamy, 2009). Esta reacción da lugar a la producción de formaldehído, peróxido de hidrógeno y amonio, que pueden tener efectos perjudiciales *per se*. El amonio es neurotóxico (Albrecht, 1998) y el peróxido de hidrógeno participa en la reacción de Fenton para producir radicales libres hidroxilo. El formaldehído ha sido implicado en el “*crosslinking*” proteico en los vasos cerebrales humanos. Estos productos afectan primariamente a las paredes de la vasculatura cerebral donde las proteínas afectadas por el “*crosslinking*” se pueden acumular. El peróxido de hidrógeno puede ser degradado

localmente por la actividad catalasa, o puede alcanzar niveles suficientes para tomar parte en reacciones de radicales libres. Todas estas consecuencias de los metabolitos de la metilamina son de gran importancia dado que las alteraciones de la vasculatura cerebral han sido implicadas en enfermedades neurodegenerativas como la AD (Zlokovic, 2005, 2011) y la ELA (Abbott, 2008).

Con el estudio del metabolismo del L-BMAA se consigue una nueva perspectiva: no sólo hay que tener en cuenta los efectos directos de este neurotóxico sobre el tejido nervioso, sino que sus metabolitos por sí mismos pueden participar en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Además, la aparición de metabolitos neurotóxicos como el ácido 2,3-diaminopropiónico amplía el rango de acciones directas sobre el tejido nervioso.

1.1.5. Efectos neurotóxicos del L-BMAA

Como ya se ha comentado anteriormente, Murch *et al.* (2004) propusieron que la unión del L-BMAA a proteínas crea un reservorio neurotóxico endógeno que libera lentamente la toxina en el tejido cerebral mediante el metabolismo proteico. Se ha propuesto que dicha liberación tendría por lo menos cinco impactos neuropatológicos diferentes (Murch *et al.*, 2004):

- a) La incorporación de aminoácidos no proteicos puede alterar el plegamiento terciario de neuroproteínas, alterando su actividad biológica.
- b) El L-BMAA asociado a proteínas tiene el potencial de formar dímeros que unan covalentemente iones metálicos (Hursthouse *et al.*, 1990), lo que puede resultar en una interrupción de las cadenas proteicas con complejos aminoacídicos no proteicos reactivos, los cuales alteran el balance iónico en las células neuronales, generando radicales libres o incluso catalizando procesos químicos deletéreos.
- c) La captura y liberación de iones metálicos, tales como Zn^{2+} , Cu^{+} , Ca^{2+} y Al^{3+} , por los complejos de L-BMAA puede interferir con la apropiada función de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Nunn *et al.*, 1989) y los receptores

ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) (Weiss y Sensi, 2000).

- d) La incorporación de este aminoácido puede truncar proteínas antes de completar su síntesis o colapsar proteínas tras su liberación del ribosoma. Esta forma de truncar la síntesis de proteínas es característica de muchas taupatías. Así, el L-BMAA puede afectar al crecimiento de las neuritas y a los niveles de proteínas de los neurofilamentos de células en cultivo (Abdulla y Campbell, 1993).
- e) El L-BMAA liberado puede actuar como agonista de receptores de aminoácidos excitadores.

1.1.5.1. Efecto del L-BMAA sobre los receptores de glutamato

Diversos estudios neuroquímicos y de unión indican que el L-BMAA es un agonista mixto de receptores de aminoácidos excitadores. Tiene una afinidad baja por los receptores NMDA que solo se exhibe en presencia de bicarbonato, pero puede activar con más potencia receptores de subtipo metabotrópico (Brownson *et al.*, 2002; Cucchiaroni *et al.*, 2010). Por lo tanto, se ha propuesto que el mecanismo de excitotoxicidad del L-BMAA se basa en los aspectos que se detallan a continuación (Lobner, 2009):

a) La acción directa sobre los receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA y AMPA):

La sobreactivación de los receptores de glutamato, sobre todo los receptores ionotrópicos NMDA, ha sido relacionada con la muerte neuronal ocurrida durante la AD, la PD y la ELA (Lipton, 2004).

En un principio, se pensó que el L-BMAA podría causar neurodegeneración por su capacidad para actuar sobre receptores NMDA e inducir excitotoxicidad a través de ellos (Ross *et al.*, 1987) y, aunque se desconocía el mecanismo por el cual este aminoácido actuaba sobre dichos receptores, Weiss y Choi (1988) descubrieron que dicha acción requería la presencia de bicarbonato y sugirieron que debía producirse una interacción entre el grupo β -amino del L-BMAA y el bicarbonato para formar una molécula capaz

de activar a estos receptores. Recientemente, Lobner *et al.* (2007) han confirmado que el L-BMAA actúa directamente sobre el sitio de unión del glutamato en estos receptores.

De acuerdo con lo descrito por Myers y Nelson (1990), el L-BMAA reacciona con el dióxido de carbono (CO_2) disuelto bajo condiciones fisiológicas de pH (7,4) y temperatura (37°C). El análisis de la reacción por ^{13}C RMN reveló que el L-BMAA reacciona con el CO_2 derivado del bicarbonato en disolución, formando un aducto covalente o carbamato que es el compuesto activo. Mediante esta reacción se forman dos carbamatos: el α -N-carboxi- β -N-metilamino-L-alanina (BMAA- α -NCO $_2$) y el β -(N-carboxi-N-metil)-amino-L-alanina (BMAA- β -NCO $_2$). Estos carbamatos se generan en sendas reacciones reversibles del dióxido de carbono con el grupo α -amino o con el grupo β -N-metilamino respectivamente. Bajo estas condiciones y con una concentración de bicarbonato de 26 mM y de L-BMAA de 3 mM, el aducto BMAA- α -NCO $_2$ supone el 22% del L-BMAA, mientras que el BMAA- β -NCO $_2$ supone un 9,6% del total. De los dos carbamatos formados, el BMAA- β -NCO $_2$ presenta una gran similitud estructural con el glutamato (son prácticamente isostéricos) (figura 2), por lo que se propuso como el principal responsable de la actividad excitotóxica del L-BMAA.

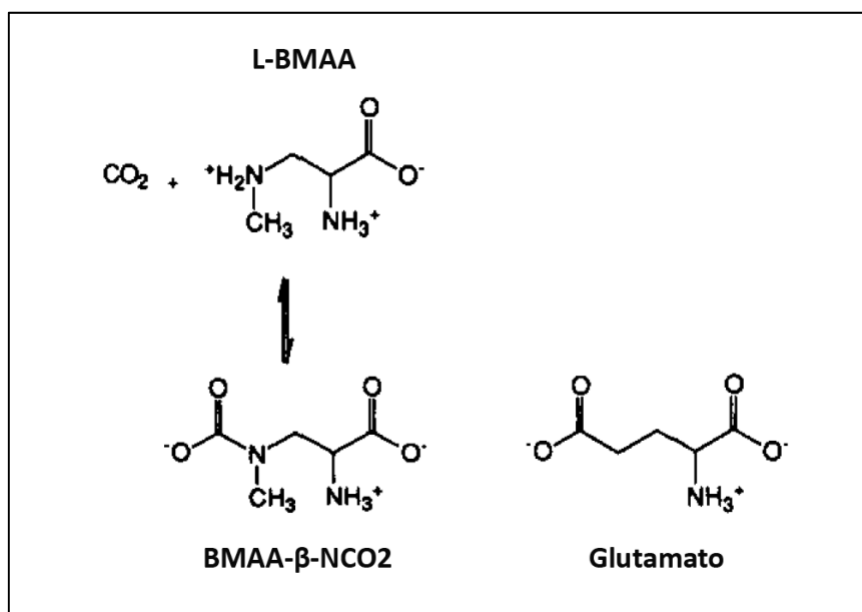


Figura 2: Estructura del L-BMAA, del BMAA- β -NCO $_2$ y del glutamato. Modificado de Myers y Nelson (1990).

Respecto a la concentración de L-BMAA necesaria para ejercer sus efectos tóxicos, tras algunos estudios previos (Ross *et al.*, 1987; Weiss y Choi, 1988; Weiss *et al.*, 1989 a, b; Zeevalk y Nicklas, 1989) en los que se observó una significativa muerte neuronal con altas concentraciones de L-BMAA, los estudios *in vitro* llevados a cabo por Lobner *et al.* (2007) demostraron una toxicidad significativa con concentraciones de L-BMAA no inferiores a 1 mM.

Es importante tener en cuenta que, aunque el L-BMAA induce muerte neuronal mediada en gran parte por la activación de receptores NMDA, los antagonistas de dicho receptor no protegen completamente de su acción (Ross *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1989 b; Lobner *et al.*, 2007), por lo que debe actuar adicionalmente a través de otros mecanismos.

Por otra parte, se ha comprobado que el L-BMAA inhibe la unión al receptor AMPA/kainato tanto del glutamato como del AMPA *in vivo* (Rakonczay *et al.*, 1991). Sin embargo, el bloqueo de este tipo de receptores no protege contra la toxicidad del L-BMAA *in vitro*, ni en ensayos con cortes sagitales de cerebro de ratón (Pai *et al.*, 1993) ni en cultivos de células disociadas de corteza (Lobner *et al.*, 2007).

La toxicidad del L-BMAA mediada a través de los receptores AMPA/kainato afecta a grupos específicos de neuronas (Lobner, 2009). Adicionalmente, en los experimentos llevados a cabo con ratones por Smith *et al.* (1990), los efectos agudos de la neurotoxicidad de este aminoácido no se bloqueaba con antagonistas de receptores NMDA pero si con antagonistas para los AMPA/kainato (Smith y Meldrum, 1990). Estos hechos podrían implicar que los efectos principales del L-BMAA en determinados grupos de neuronas no están mediados por los receptores NMDA.

Estos grupos de neuronas sensibles a la toxicidad del L-BMAA mediada a través los receptores AMPA/kainato, son: un pequeño grupo de neuronas corticales que se distinguen por la presencia de NADPH-diaforasa (Weiss *et al.*, 1994) y las motoneuronas (Lobner, 2009). Posiblemente la alta sensibilidad de estos dos tipos específicos de neuronas se deba a que contienen un gran número de receptores permeables a calcio AMPA/kainato (Weiss *et al.*, 1994; Carriedo *et al.*, 1995).

Posteriormente, Rao *et al.* (2006) constataron que las motoneuronas espinales son más sensibles al L-BMAA que el resto de neuronas en cultivo aisladas de médula espinal, y que el daño causado se evita en presencia de NBQX, un antagonista de receptores de AMPA/kainato, pero no en presencia de MK-801, un antagonista del receptor NMDA, lo que demuestra que el L-BMAA actúa directamente sobre los receptores AMPA/kainato.

Finalmente, Liu *et al.* (2010) demostraron que distintos tipos neuronales son más o menos sensibles a la toxicidad provocada por el L-BMAA dependiendo de los receptores de glutamato que expresan. Ensayaron distintas concentraciones de L-BMAA en cultivos de septo, rico en neuronas colinérgicas, y de mesencéfalo, rico en neuronas dopaminérgicas. Determinaron que la LC_{50} era mucho más baja para las neuronas colinérgicas (32 μ M) que para las neuronas dopaminérgicas (304 μ M). Además, la muerte de las neuronas mesencefálicas se atenuaba con un antagonista del receptor de NMDA, mientras que la muerte de las neuronas colinérgicas disminuía con un antagonista del receptor AMPA/kainato, muy abundante en este tipo de neuronas.

Estos trabajos respaldan la idea de que algunos grupos neuronales que contienen receptores AMPA permeables a calcio, son más sensibles a la toxicidad del L-BMAA.

b) La activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR5 y mGluR1):

Se ha descrito que el L-BMAA activa potentemente receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) en neuronas del hipocampo, del estriado y del cerebelo (Copani *et al.*, 1990, 1991; Manzoni *et al.*, 1991; Staton y Bristow, 1998; Lobner *et al.*, 2007).

Existen dos grupos de receptores metabotrópicos de glutamato. El grupo 1 induce la hidrólisis de fosfatidilinositol con la consiguiente formación de inositol trifosfato (IP3) y posterior liberación de calcio del retículo endoplásmico (Lobner, 2009). Se ha comprobado que la activación de estos receptores induce muerte neuronal (Strasser *et al.*, 1998). El L-BMAA presenta baja afinidad por mGluR1, un subtipo de receptor del grupo 1 de receptores metabotrópicos, pero lo activa con gran potencia (Manzoni *et al.*, 1991). También es capaz de activar otro subtipo del grupo 1, los receptores mGluR5, a través de los cuales puede inducir muerte neuronal en cultivos neuronales

(Lobner *et al.*, 2007). Es posible que el aumento de calcio provocado por este subtipo de receptores tenga efectos aditivos con el aumento de calcio provocado por la activación de los receptores NMDA o los receptores AMPA (Lobner, 2009).

Cucchiaroni *et al.* (2010) estudiaron el efecto del L-BMAA sobre las neuronas de la *pars compacta* de la sustancia negra. La activación del mGluR1 por L-BMAA causa la despolarización de membrana y el incremento de la concentración de calcio intracelular en las neuronas dopaminérgicas. Además, su aplicación prolongada causa importantes alteraciones funcionales que incluyen liberación de citocromo *c* de la mitocondria y la producción de especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, la activación del grupo 2 de mGluRs causa un descenso de los niveles de cAMP que podría ser neuroprotector (Buisson y Choi, 1995). Se ha descrito que el L-BMAA inhibe la formación de AMPc inducida por forskolina cuando actúa a través de estos receptores, aunque este efecto tiene poca potencia (Genazzani *et al.*, 1993).

Todos estos resultados ofrecen la idea de que las respuestas al L-BMAA pueden depender de las isoformas de los receptores de glutamato, expresados en cada tipo celular, a los que se une preferentemente el aminoácido (Cucchiaroni *et al.*, 2010). La respuesta celular inducida por el L-BMAA puede depender además, de la localización de los mGluRs en la membrana celular (Hubert *et al.*, 2001), que se traduce en la accesibilidad del L-BMAA a los receptores.

1.1.5.2. Efecto del L-BMAA sobre el antiporte cistina/glutamato (sistema xc-)

El sistema xc- se encarga del transporte de cistina hacia el interior celular intercambiándolo por glutamato que es transportado hacia el exterior de la célula (Liu *et al.*, 2009). Dada la función de este sistema, este parece tener un importante papel en la supervivencia y la muerte celular. Se ha demostrado que en cultivos corticales mixtos que la absorción de cistina se produce principalmente por parte de los astrocitos (Lobner, 2009).

La cistina es el precursor para la producción de glutatión, el eliminador (“*scavenger*”) de radicales libres endógeno. Por lo tanto, el sistema xc- puede afectar a la supervivencia celular por dos mecanismos distintos: a) la liberación de glutamato puede incrementar la concentración de glutamato extracelular y, potencialmente, causar excitotoxicidad, b) a través de la toma de cistina el sistema puede regular los niveles de glutatión y esto puede determinar si ocurrirá muerte neuronal inducida por estrés oxidativo (Liu *et al.*, 2009).

Diversos autores han encontrado que la muerte neuronal inducida por L-BMAA, incluye acciones sobre el sistema xc- tanto mediante la inhibición de la toma de cistina como incrementando la liberación de glutamato (Murphy *et al.*, 1989, 1990; Fogal *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Recientemente, se ha demostrado en el modelo de ELA familiar de ratón SOD1G93A (uno de los modelos más aceptados para el estudio de la enfermedad) que existe un incremento de la actividad del sistema xc- que puede ser el causante de la excitotoxicidad, al menos en momentos tempranos (Albano *et al.*, 2013). Además, existen evidencias de que la depleción de glutatión juega un papel importante en la AD, la PD y la ELA (Bains y Shaw, 1997; Liu *et al.*, 2004; Zeevalk *et al.*, 2008).

En el proceso de inhibición del L-BMAA sobre el sistema xc- (figura 3), se ha sugerido que el L-BMAA compite con la cistina, por lo que sería transportado hacia el interior celular, dando lugar al incremento de la liberación de glutamato, que sería responsable de parte de la muerte neuronal mediada por receptores de glutamato (Liu *et al.*, 2009).

Dependiendo de las distintas condiciones subyacentes, es posible que la exposición al L-BMAA pueda conducir a distintos desórdenes. Muchas enfermedades neurodegenerativas parecen implicar la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA (Lipton, 2004) y el estrés oxidativo (Cui *et al.*, 2004), y la activación del mGluR5 ha sido implicada en la PD (Marino *et al.*, 2003). Todos estos mecanismos de daño neuronal parecen estar potenciadas por el L-BMAA (Liu *et al.*, 2009).

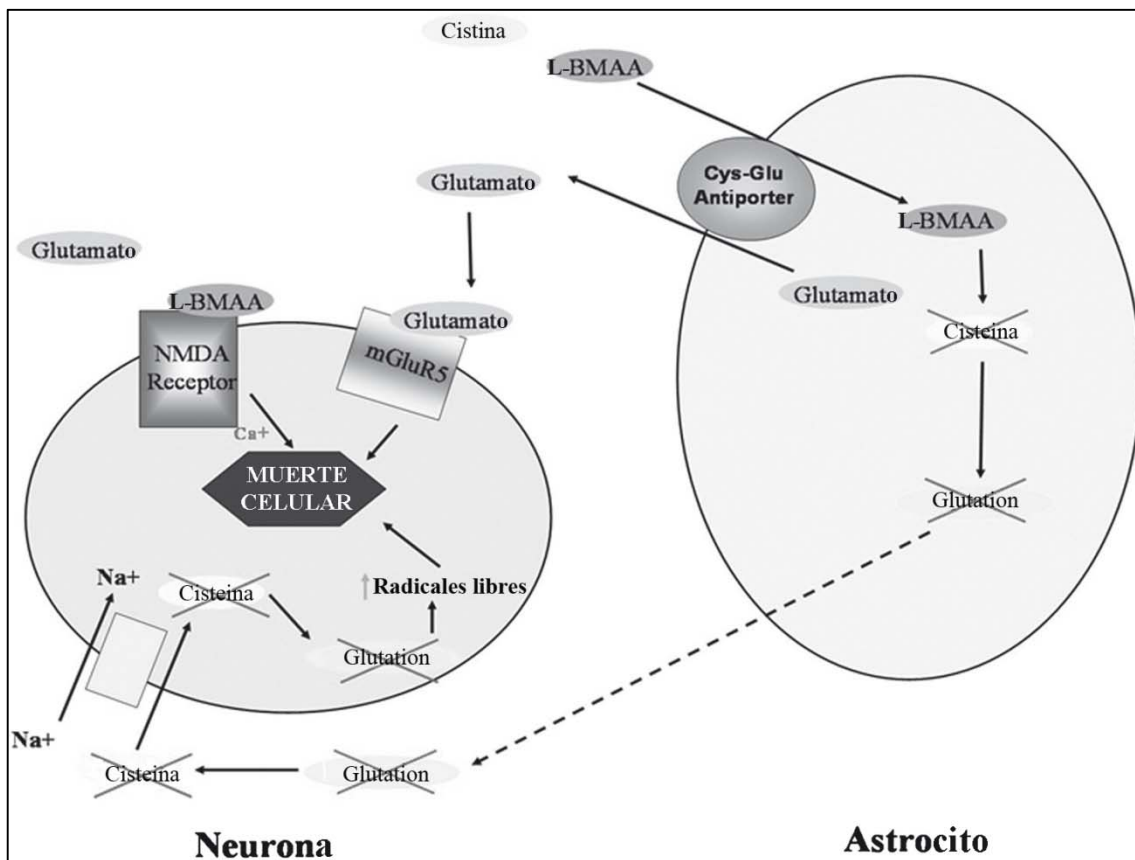


Figura 3. Modelo propuesto de la acción del L-BMAA sobre el sistema xc^- . Adaptado de Lobner (2009).

1.2. Esclerosis Lateral Amiotrófica

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es el término usado para cubrir el espectro de síndromes neurodegenerativos caracterizados por la degeneración progresiva de las motoneuronas (Wijesekera y Leigh, 2009). También es conocida como la Enfermedad de la Motoneurona, la enfermedad de Charcot o la enfermedad de Lou Gehrig.

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una parálisis muscular progresiva que refleja la degeneración de las neuronas motoras en el córtex motor primario, los tractos corticoespinales, el tronco encefálico y la médula espinal (Wijesekera y Leigh, 2009). La mayoría de los casos de ELA son esporádicos, pero aproximadamente del 5-10% de los casos son familiares.

En cuanto a su patogénesis, en el interior de las motoneuronas cabe destacar la presencia de eventos anómalos como la desregulación de la homeostasis proteica celular, la afectación del proceso de autofagia, la formación de agregados proteicos, el estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial, la formación de proteínas aberrantes, la disfunción del transporte axonal y el desensamblaje del citoesqueleto, así como el fallo sináptico (figura 4) (Robberecht y Philips, 2013).

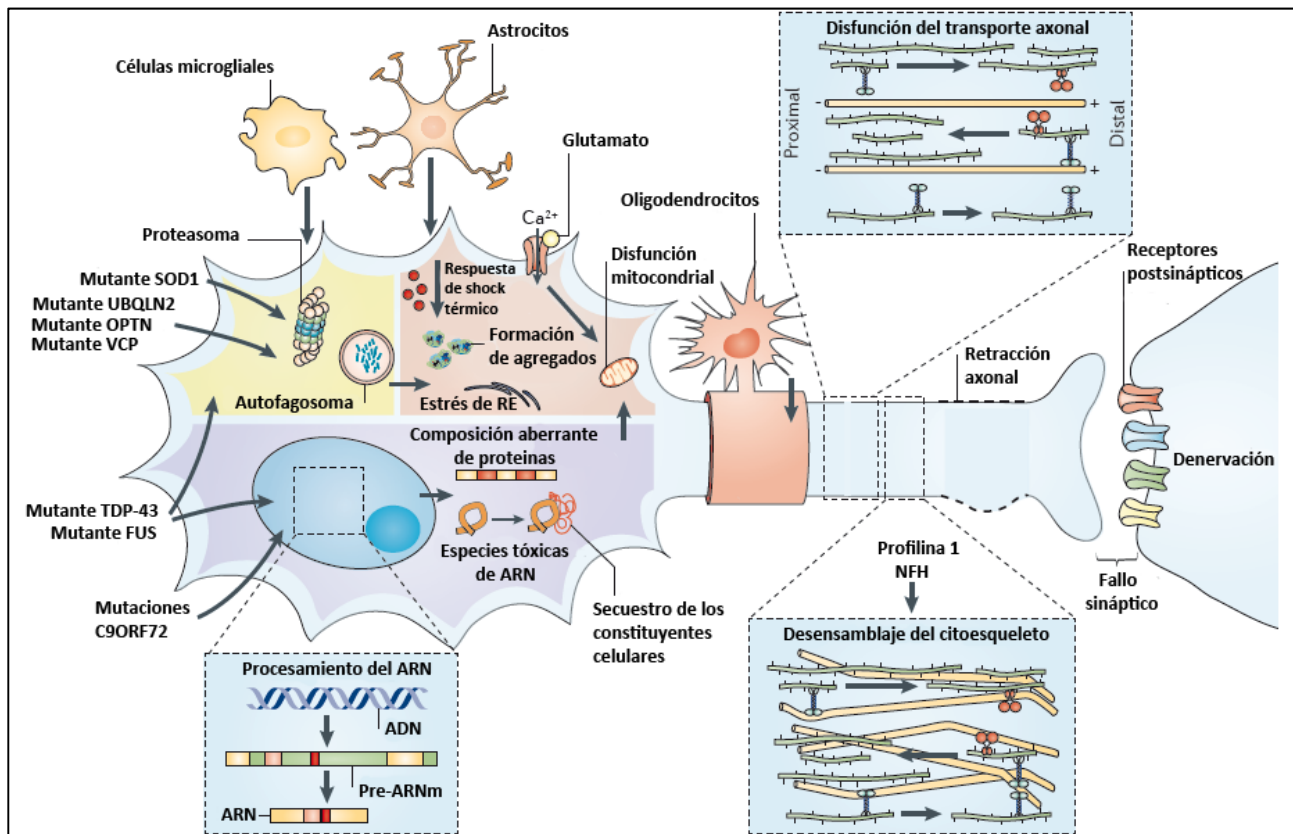


Figura 4: Visión general de los eventos que acontecen en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En este esquema se representan diversas mutaciones causantes de la ELA, relacionadas con las anomalías celulares. Adaptado de Robberecht y Philips, 2013.

Aunque la ELA no es primariamente un desorden de autoinmunidad o desorden inmune, existen considerables evidencias de procesos inflamatorios y de que células no-nerviosas pueden jugar una parte de la patogénesis de la ELA. Tanto en humanos con ELA como en ratones transgénicos SOD1 se ha encontrado una prominente activación microglial y de células dendríticas (Troost *et al.*, 1989, 1990; Kawamata *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1998; Graves *et al.*, 2004; Henkel *et al.*, 2004). Estas células no-

neuronales producen citokinas inflamatorias como interleukinas, COX-2, TNF α y MCP-1, y se ha encontrado evidencia de su sobrerregulación en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes y en modelos *in vitro* (Sekizawa *et al.*, 1998; Almer *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2001; Wilms *et al.*, 2003).

1.2.1. Sintomatología

Esta enfermedad puede debutar de dos formas clínicas principales: la forma espinal, que presentan dos tercios de los casos, y la forma bulbar. En la forma espinal los síntomas están relacionados con debilidad muscular focal y pueden empezar tanto distalmente como proximalmente en las extremidades superiores e inferiores. Gradualmente, la espasticidad (rigidez muscular) puede desembocar en extremidades débiles atrofiadas, afectando a la destreza manual y a la marcha. Ocasionalmente los síntomas encontrados incluyen disfunción de vejiga (como urgencia de micción), síntomas sensoriales, síntomas cognitivos e implicación multi-sistema (por ejemplo la demencia y el parkinsonismo) (Wijesekera y Leigh, 2009).

Los pacientes con debut bulbar normalmente presentan disartria (dificultad para pronunciar las palabras debido a problemas de los músculos que ayudan a hablar) y disfagia (problemas en la deglución) para sólidos y líquidos. Los síntomas en las extremidades se pueden desarrollar casi simultáneamente con los síntomas bulbares en estos pacientes.

Por lo tanto, las vías nerviosas que controlan la deglución pueden estar afectadas en estos pacientes. El control neurológico de la deglución comprende cuatro componentes: 1) las fibras sensoriales aferentes contenidas en cuatro nervios craneales (V, VII, IX, X); 2) las fibras motoras eferentes contenidas en cinco nervios craneales (V3, VII, IX, X, XII) y dos nervios periféricos cervicales; 3) los centros pares de deglución del tallo cerebral en el bulbo, y 4) el impulso neural modificado desde el puente, el sistema límbico-hipotalámico, el cerebelo y la corteza prefrontal (Rebolledo, 2005). Los centros de deglución del tallo cerebral integran y procesan varias señales de ingreso desde las fibras sensoriales bucofaríngeas y centros más elevados del sistema nervioso central y luego organizan el proceso de deglución por medio de fibras motoras eferentes en los nervios craneales. El impulso nervioso sensorial a los centros

de deglución bulbar es proporcionado principalmente por el IX y X pares craneales, con cierto impulso desde la rama maxilar superior del nervio trigémino (V3) y del facial (VII) (Dodds *et al.*, 1990). El mismo tipo de estimulación en la misma región anatómica puede evocar respuestas motoras diferentes, por ejemplo, deglución en comparación con náusea o vómito (Miller, 1982).

Por otra parte, se reconoce que los pacientes con ELA pueden exhibir un rango de anormalidades cognitivas, desde la disfunción frontal ejecutiva (en el 20-40% de los pacientes), a una patente demencia fronto-temporal lobar (FTLD) (aproximadamente en el 5% de los casos).

La parálisis progresiva conduce a la muerte por fallo respiratorio entre 2-3 años tras el debut de los casos bulbares y 3-5 años tras el debut de los casos espinales. Sin embargo, los pacientes que han sido mantenidos con vida mediante respiración asistida desarrollan finalmente un profundo estado de parálisis motora denominado “estado de total enclaustramiento”, donde hay una parálisis de todos los músculos voluntarios y varios grados de disfunción oculomotora (Wijesekera y Leigh, 2009).

1.2.2. Tipos de ELA

1.2.2.1. ELA familiar

Aproximadamente el 5% de los pacientes tienen una historia familiar de ELA. Frecuentemente se presenta una herencia Mendeliana y una gran penetrancia, teniendo la mayoría de los casos un patrón de herencia autosómica dominante, aunque también se han descrito casos de herencia autosómica recesiva (Mulder *et al.*, 1986; Gros-Louis *et al.*, 2006). Normalmente la edad de debut de la ELA familiar es una década más temprana que la ELA esporádica y presenta una distribución Gausiana norma. Afecta a hombres y mujeres por igual y presentan una supervivencia menor que los casos de ELA esporádica. El 20 % de los casos con ELA familiar autosómica dominante tienen mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa Cobre-Zinc (SOD1).

La ELA juvenil es el término usado cuando la edad de debut es menor de 25 años (Ben Hamida *et al.*, 1990). La mayoría de los casos son autosómicos recesivos, aunque se ha descrito la herencia dominante ligada al cromosoma 9q34 (ALS4, senataxina) (Chance

et al., 1998; Blair *et al.*, 2000). Las formas recesivas han sido mapeadas en las regiones cromosomales 2q33 (ALS2, alsina) y 15q12-21 (Hentati *et al.*, 1994, 1998).

1.2.2.2. ELA esporádica

La media de edad del debut de la ELA esporádica varía entre los 55 y los 65 años, con sólo el 5% de los casos con debut antes de los 30 años. Existe una prevalencia ligeramente superior en los hombres. En la década de los 90 la incidencia de la ELA esporádica estaba entre 1,5 y 2,7 por 100.000 habitantes/año en Europa y Norte América, con una incidencia dependiente de la edad (Wijesekera y Leigh, 2009).

Hasta el momento no se conoce la causa de la ELA esporádica, aunque varios compuestos ambientales han sido implicados como potenciales agentes etiológicos (Banack *et al.*, 2010 b). El factor de riesgo más documentado y relativamente bien establecido es fumar (Armon, 2009; Gallo *et al.*, 2009; Alonso *et al.*, 2010). También se han propuesto otras asociaciones como la exposición ocupacional a radiaciones electromagnéticas, el contacto con pesticidas y metales pesados, como el plomo y el mercurio, y la posible exposición a formaldehído. Entre los desencadenantes ambientales de la ELA, el L-BMAA se sitúa en un lugar destacado dados sus ya citados efectos neurotóxicos y su naturaleza ubicua, que apoyan su potencial papel en la etiología de la ELA esporádica.

1.2.3. Patogénesis de la degeneración de motoneuronas en la ELA

Los marcadores patológicos de la ELA son la degeneración y la pérdida de motoneuronas con gliosis astrocítica, y la presencia de inclusiones intracelulares en neuronas y células gliales en proceso de degeneración. La patología de las motoneuronas superiores en la ELA se indica por la despoblación de células de Beltz en la corteza motora (área 4 de Broadman), una gliosis astrocítica variable, que afecta tanto a la materia gris como a la materia blanca subcortical de la corteza motora, y la pérdida axonal dentro de la vía piramidal motora descendente asociada con la gliosis de los tractos corticospinales (Ince y Wharton, 2007).

La patología de las motoneuronas inferiores afecta primariamente a las motoneuronas del asta ventral de la médula espinal y el tronco encefálico. Se ha encontrado en autopsias de pacientes una reducción de hasta el 50% en el número de motoneuronas inferiores, pero existe gran variabilidad entre los casos y entre los diferentes niveles espinales afectados (Ince y Wharton, 2007).

Como sucede en otras enfermedades neurodegenerativas, parece que la degeneración neuronal en la ELA se debe a una compleja interacción entre múltiples mecanismos celulares patogénicos que no tienen por qué ser mutuamente excluyentes.

1.2.3.1. Factores genéticos

Sólo el 20% de los casos de ELA familiar presentan mutaciones en el gen de la SOD1. En amplias revisiones (Wijesekera y Leigh, 2009; Al-Chalabi *et al.*, 2012; Robberecht y Philips, 2013) se resumen el gran número de mutaciones que han sido asociadas con la ELA familiar y sus características clínicas. Algunos de estos genes mutados son los de la alsina (ALS2), la sentaxina (ALS4), la proteína de membrana asociada a vesícula (VAPB, ALS8), angiogenina y la subunidad p150 de la dinactina (DCTN1). Varias de estas mutaciones ligadas a la ELA familiar están implicadas directamente en la proteostasis, lo que evidencia el fallo en la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina como un factor en la patogénesis de la ELA (Robberecht y Philips, 2013).

Además de las mutaciones reconocidas en la ELA familiar, se describen una serie de mutaciones presentes en pacientes de ELA esporádica, como la mutación de SOD1 presente en el 2% de los pacientes de ELA esporádica, o la del gen TARDBP (que codifica la proteína de unión al ADN TAR-43 (TDP-43)). Además, parece existir un mayor riesgo de padecer la enfermedad en familiares de aquellos con ELA esporádica (Al-Chalabi *et al.*, 2012). Por lo tanto, existen considerables evidencias de una contribución genética a todos los tipos de ELA (Al-Chalabi *et al.*, 2012). Las mutaciones de estos y otros genes identificadas en casos esporádicos, podrían aumentar la susceptibilidad a la ELA. Estos hallazgos apoyan las sospechas de algunos autores que proponen que la exposición al L-BMAA puede provocar enfermedades neurodegenerativas en individuos susceptibles a padecerlas (Pablo *et al.*, 2009).

1.2.3.2. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es el daño neuronal producido por la excesiva estimulación inducida por el glutamato en los receptores pos-sinápticos de glutamato (Wijesekera y Leigh, 2009). Ésta estimulación excesiva de los receptores de glutamato resulta en un flujo masivo de calcio hacia el interior neuronal, conduciendo a un incremento de la formación de óxido nítrico y de este modo a la muerte neuronal.

Los niveles de glutamato en el LCR están elevados en algunos pacientes con ELA (Rothstein *et al.*, 1990; Shaw *et al.*, 1995). Rothstein *et al.* (1995) atribuyeron ésta elevación a la severa pérdida del transportador de aminoácidos excitatorios astroglial EAAT2 (GLT-1 en ratones), que llegaba al 71% de descenso en el cortex motor y la médula espinal de pacientes *post mortem* respecto a los controles. Así pues, parece que éste transportador no es capaz de eliminar suficiente glutamato de la sinapsis. Dado que no hay pérdida de astrogliá en ELA, las anomalías en EAAT2 podrían reflejar un defecto en la proteína primaria, una pérdida secundaria debida a regulación a la baja y otros procesos tóxicos.

Puesto que la excitotoxicidad juega un importante papel en el desarrollo de la ELA, el astrocito se situaría en un papel central en este proceso. Aunque muchos trabajos se centren en buscar genes cuyos cambios puedan subyacer la patogénesis de la ELA esporádica, estos cambios podrían ser el resultado de una agresión producida por algún agente ambiental que actúe primero sobre astrocitos particulares estrechamente relacionados con las motoneuronas (Sica *et al.*, 2011).

1.2.3.3. Déficits en factores neurotróficos

En pacientes de ELA y en modelos *in vitro* se han observado niveles disminuidos de factores neurotróficos (e.g. CTNF, BDNF, GDNF y IGF-1) (Anand *et al.*, 1995; Elliott y Snider, 1996; Oppenheim, 1996). Además, en humanos han sido descritas tres mutaciones en el gen de VEGF asociadas con un riesgo incrementado de desarrollar ELA esporádica (Lambrechts *et al.*, 2003).

1.2.3.4. Agregación proteica

Las inclusiones intracitoplásmicas son una característica tanto de la ELA familiar como de la esporádica. Aunque aún no está claro su papel en la patogénesis: la formación de agregados proteicos puede causar directamente toxicidad celular, los agregados pueden ser productos “inocentes” del proceso de neurodegeneración o bien puede ser realmente un proceso beneficioso, formando parte de un mecanismo de defensa para reducir las concentraciones intracelulares de proteínas tóxicas (Shaw, 2005; Cozzolino *et al.*, 2008). La agregación proteica puede estar ligada, además, con una patología en los sistemas de síntesis y degradación proteica observada en pacientes con ELA y con mecanismos de muerte neuronal programada (Al-Chalabi *et al.*, 2012).

Se han descrito varios tipos de agregados proteicos en ELA: a) cuerpos Bunina, que son pequeñas inclusiones hialinas intracitoplásmicas eosinofílicas, positivas para el marcaje para cistatina y transferrina, presentes entre el 70-100% de los casos; b) inclusiones ubiquitinadas que son casi universales en la ELA y sus variantes (~95% de los casos), con la proteína TDP-43 como constituyente principal; c) inclusiones hialinas conglomeradas (neurofilamentos) (HCIs), que se asocian más a la ELA familiar y raramente se ven en la esporádica (Wijesekera y Leigh, 2009).

La agregación de los neurofilamentos es de especial importancia teniendo en cuenta que las neuronas son células profundamente especializadas que dependen de su estructura para la realización de sus funciones. Tanto en la ELA esporádica como en la familiar se ha encontrado acumulación de neurofilamentos debida al mal ensamblaje de los mismos (Al-Chalabi *et al.*, 2012).

Van Welsem *et al.* (2002) investigaron la relación entre la pérdida neuronal en las astas anteriores (a nivel cervical y lumbar) y en el núcleo hipogloso en pacientes de ELA, y la aparición de los cuerpos Bunina y las inclusiones similares a madejas (inclusiones ubiquitinadas). Encontraron una correlación significativa entre la severidad de la pérdida neuronal y la proporción de neuronas que contenía inclusiones similares a madejas. Sin embargo, esta correlación no se halló en el caso de los cuerpos Bunina, por lo que se dedujo que estos dos tipos de inclusiones participan en dos pasos distintos de la cascada que conduce a la muerte neuronal. Estos mismos autores

señalaron que la presencia de inclusiones similares a madejas en áreas donde la pérdida neuronal es prominente puede ser indicativa de un último intento de la neurona para deshacerse de las proteínas deletéreas antes de la muerte (Van Welsem *et al.*, 2002).

Por otro lado, se han encontrado otras proteínas agregadas en algunos tejidos de pacientes *post mortem*, en la amígdala y el cortex entorrinal, implicadas en la arquitectura axonal, como son: α -internexina, periferina y tau.

Adicionalmente, el transporte axonal puede verse comprometido por otras causas. Los axones de las motoneuronas cuentan con sistemas de transporte intracelular de gran importancia para el correcto funcionamiento neuronal. Estos sistemas constan de un sistema de transporte anterógrado y un sistema de transporte retrógrado, que dependen de “motores moleculares”, el complejo proteico de la kinesina (para el anterógrado) y el complejo dineina-dinactina (para el retrogrado) (De Vos, 2008). Los modelos de ratón transgénico SOD1 muestran evidencias de que ambos sistemas de transporte están ralentizados (Williamson y Cleveland, 1999; De Vos, 2008).

1.2.3.5. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo surge de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la habilidad del sistema para eliminar o reparar el daño causado y así restablecer el ambiente reducido predominante (Barber y Shaw, 2008). El estrés oxidativo ha sido ampliamente ligado a la neurodegeneración y se sabe que la acumulación de ROS causa la muerte celular.

Se conoce que la producción de ROS aumenta con la edad y, dado que la mayoría de los casos de ELA se diagnostican a partir de los 50 años, el estrés oxidativo puede jugar un papel importante en el desarrollo final de la enfermedad (Wijesekera y Leigh, 2009).

Como ya se ha comentado anteriormente, los procesos patológicos de la ELA son complejos e incluyen toda una serie de alteraciones como la excitotoxicidad, la disfunción del citoesqueleto, la agregación proteica, la participación de células no-neuronales y defectos en el procesamiento y el tráfico de ARN. El estrés oxidativo ha

sido implicado en muchos de estos procesos ya sea como causa primaria o como una consecuencia (figura 5) (Wijesekera y Leigh, 2009). Por este motivo algunos autores han llevado a cabo importantes revisiones sobre las implicaciones del estrés oxidativo en el desarrollo de la ELA y de otras enfermedades neurodegenerativas (Robberecht, 2000; Wijesekera y Leigh, 2009; Gandhi y Abramov, 2012).

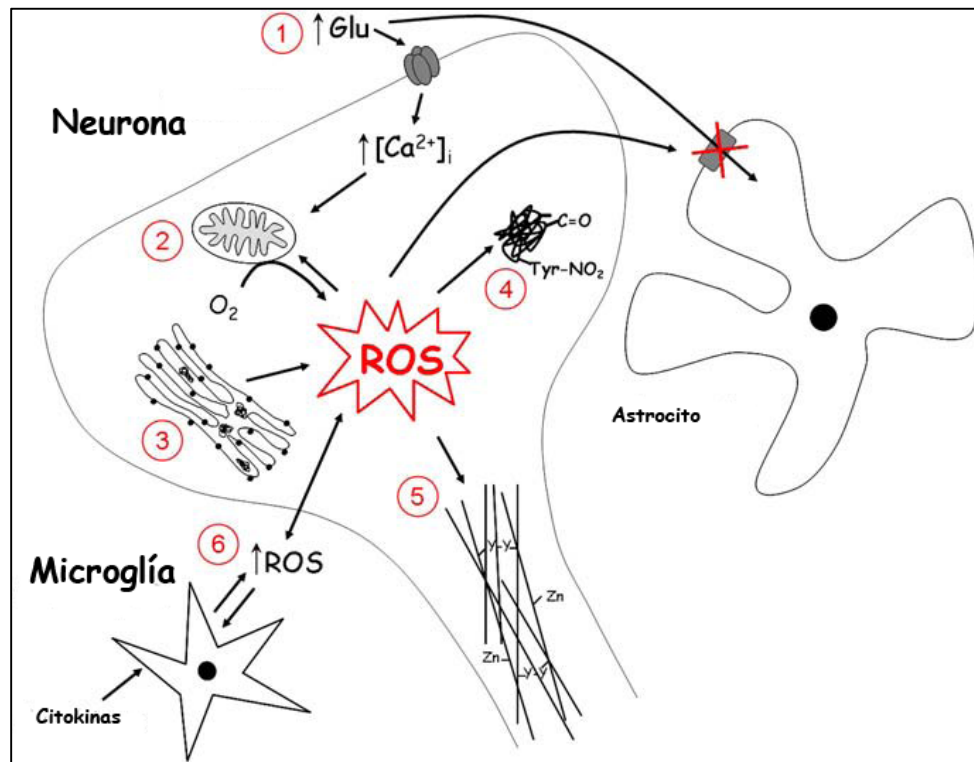


Figura 5: El estrés oxidativo puede exacerbar otros mecanismos neurodegenerativos en la ELA. 1) la excitotoxicidad del glutamato incrementa los niveles intracelulares de calcio, los cuales son tamponados por las mitocondrias conduciendo a un incremento de la producción de ROS. Estos ROS pueden inhibir a su vez la recaptura de glutamato por los astrocitos, de forma que aumenta la concentración extracelular de glutamato. 2) La elevada demanda de energía de las motoneuronas se suple por las mitocondrias, pero implica una mayor fuga de electrones en la cadena respiratoria que aumenta la producción de ROS. 3) La activación prolongada de la respuesta a proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico aumenta también la producción de ROS. 4) Las reacciones oxidativas aberrantes aumentan la producción de peroxinitrito altamente reactivo y radicales hidroxilo, que provocan la nitración y la agregación de proteínas. 5) Las ROS pueden atacar las subunidades de neurofilamentos, causando la unión cruzada de proteínas por ditirosina y la agregación de las subunidades de neurofilamentos. 6)

Las ROS pueden cruzar la membrana celular y activar la microglía, que responde mediante la liberación de citokinas y más producción de ROS. Adaptado de Barber y Shaw (2009).

1.2.3.6. Disfunción mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo crítico dentro de las células ya que ejecuta múltiples funciones. Las mitocondrias son el primer sitio de producción de ATP, mantienen la homeostasis del calcio, participan en la señalización por calcio y regulan la apoptosis intrínseca (Shi *et al.*, 2010 a). La disfunción mitocondrial confiere efectos pleiotrópicos a la célula, especialmente a las neuronas con una elevada susceptibilidad a la edad y el estrés.

En este marco, se puede decir que la mitocondria es la estructura más crucial que puede verse afectada por el estrés oxidativo. Por si mismas son la mayor fuente de ROS cuando la excitotoxicidad afecta a la neurona; dentro de estas circunstancias el descenso de la actividad de los complejos respiratorios I y III conlleva un aumento de la producción de ROS. En la ELA esporádica, los radicales libres (anión superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (HO^-) y óxido nítrico (NO) principalmente) pueden alcanzar niveles tóxicos y dañar células de diferentes tejidos (Sica *et al.*, 2011).

Bajo condiciones de estrés oxidativo la morfología de la mitocondria cambia: se vuelve pequeña y con las crestas interrumpidas. Se ve erosionada por edema, cristolisis y vacualización, mientras que sus membranas se rompen (Sasaki e Iwata, 2007). Estas alteraciones no sólo se han encontrado en motoneuronas sino que también han sido observadas en las células del hígado y del músculo de pacientes con ELA esporádica (Sica *et al.*, 2011).

A causa del incremento del estrés oxidativo, se han descrito anormalidades en la morfología y la bioquímica mitocondrial en distintos tejidos de pacientes de ELA, ratones transgénicos SOD1 y modelos celulares (Kong y Xu, 1998; Krasnianski *et al.*, 2005; Hirano *et al.*, 2008). Las mitocondrias de pacientes de ELA muestran niveles elevados de calcio y descenso de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria I y IV, lo que implica un metabolismo energético defectuoso (Siklos *et al.*,

1996; Wiedemann *et al.*, 1998). También se han descrito mutaciones del ADN mitocondrial en pacientes de ELA (Dhaliwal y Grewal, 2000; Ro *et al.*, 2003).

Otra de las importantes funciones que lleva a cabo la mitocondria es el tamponamiento de las sobrecargas de Ca^{2+} intracelulares (Shi *et al.*, 2010 a). En células excitables como las motoneuronas, juegan un importante papel en el manejo a corto plazo de las corrientes rápidas citosólicas de Ca^{2+} . El Ca^{2+} es un segundo mensajero ubicuo y participa en muchas vías de señalización que son cruciales para la supervivencia celular. En pacientes y en modelos animales y celulares de ELA, se han encontrado concentraciones incrementadas de Ca^{2+} y daño mitocondrial (Reiner *et al.*, 1995; Damiano *et al.*, 2006; Jaiswal *et al.*, 2009).

El transporte mitocondrial dañado se ha observado igualmente en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la ELA (revisado por Shi *et al.*, 2010 b). La estructura, la posición y la función de la mitocondria están reguladas por la biogénesis mitocondrial, la fusión y la fisión, el transporte y el aclaramiento.

Es lógico pensar que la morfología mitocondrial, la función metabólica, el potencial de membrana, el transporte axonal y la fisión y fusión de mitocondrias son altamente interdependientes. La interrupción del balance de estos procesos puede resultar en fragmentación, elongación o agregación mitocondrial (Chan, 2006). Además, la dinámica mitocondrial ha sido estrechamente relacionada con la regulación de la apoptosis y la homeostasis del calcio (Shi *et al.*, 2010 b).

Se ha descrito que durante la apoptosis el balance dinámico de la fusión y la fisión mitocondrial está alterado, lo que conduce a una extensiva fragmentación de las mitocondrias y la liberación de factores proapoptóticos (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003). Estas mitocondrias fragmentadas tienen una menor capacidad de tamponar Ca^{2+} y probablemente causen la muerte selectiva de motoneuronas en ELA (Carriedo *et al.*, 2000).

1.2.3.7. Alteración de la vía secretora en la ELA

Como ya se ha mencionado anteriormente, una de las características más importantes de la ELA es la aparición de inclusiones intracelulares y agregados proteicos que están estrechamente relacionados con la alteración del proceso de síntesis y degradación proteica en las neuronas. Por ello ha surgido un nuevo concepto que se centra en el estrés de la vía secretora en el proceso patológico de la enfermedad (Nassif *et al.*, 2010; Walker y Atkin, 2011).

Las alteraciones de la vía secretora incluyen un fallo en la maquinaria de plegamiento del retículo endoplásmico (RE), el compromiso de la respuesta a proteínas mal-plegadas (UPR), la modificación de la red del aparato de Golgi (AG), tráfico vesicular dañado, inhibición de los mecanismos de control de calidad de proteínas, daño oxidativo a las proteínas del RE, y activación sostenida de vías degenerativas como la autofagia (Nassif *et al.*, 2010). La alteración de todos estos procesos provoca una anormal homeostasis proteica que se asocia a la acumulación de proteínas mal-plegadas en el retículo endoplásmico, posiblemente conduciendo a estrés de RE crónico y disfunción neuronal.

a) Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento subcelular esencial responsable de la síntesis de lípidos y proteínas. El RE se encarga del plegamiento de las proteínas nativas, de las modificaciones post-traduccionales y del tráfico de muchas proteínas transmembrana y de secreción (Walker y Atkin, 2011). Después de la translocación al lumen del RE por el canal del complejo translocón, las proteínas nacientes son asistidas por una compleja familia de chaperonas, foldasas y co-factores (Nassif *et al.*, 2010).

Las proteínas que superan el “control de calidad” son transportadas a través de la vía secretora hasta alcanzar su destino final. Este control de calidad usa el mecanismo de la degradación asociada al RE (ERAD) para eliminar las proteínas mal-plegadas o mal-ensambladas generadas durante el proceso de plegamiento (Ellgaard y Helenius, 2003). El ERAD consiste en chaperonas, proteínas transmembrana y enzimas asociadas a ubiquitina que seleccionan, dirigen y retrotranslocan las proteínas mal-plegadas al

citoplasma para su degradación por el sistema proteasomal. El mal funcionamiento de este mecanismo (ERAD) ha sido implicado en algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas al plegamiento erróneo de proteínas como la HD, la AD y la ELA (Nishitoh *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2009, Slodzinski *et al.*, 2009).

El estrés de RE es la condición celular en la que las funciones del RE han sido alteradas conduciendo en consecuencia a un anormal plegamiento de proteínas y a la acumulación de proteínas mal-plegadas (Nassif *et al.*, 2010). Diversas alteraciones celulares pueden dar lugar al estrés de RE, y dependiendo de la duración de esta condición la respuesta celular puede pasar por dos fases distintas: la fase adaptativa y la fase apoptótica.

La fase adaptativa se caracteriza por un descenso general de la traducción proteica, por la regulación al alza de los genes diana de la UPR, así como de aquellos genes que codifican chaperonas del RE y por una expansión del volumen de este orgánulo, vía incremento de la producción lipídica (Nassif *et al.*, 2010; Walker y Atkin, 2011). Este mecanismo de respuesta fisiológica transitoria normalmente es suficiente para solventar un daño a corto plazo. Sin embargo, si no se recupera la homeostasis, se activa la muerte celular por apoptosis.

En la fase apoptótica, la familia de proteínas reguladoras pro- y anti-apoptóticas BCL-2 juegan un papel principal, con la activación final de las proteínas mitocondriales BAK y BAX, lo que conlleva la liberación de citocromo c y la apoptosis (Nassif *et al.*, 2010). La regulación de la familia BCL-2 por la UPR provee una interacción directa entre el RE y la mitocondria, de forma que los daños relacionados con el plegamiento incorrecto de proteínas desencadenan la vía de muerte celular intrínseca clásica en la mitocondria. Además, el estrés de RE puede activar a la kinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) que activa la vía apoptótica de estrés de RE, posiblemente a través de la activación de la caspasa-12 (Nishitoh *et al.*, 2002). En este sentido, Yamamuro *et al.* (2011), describieron que el estrés RE puede causar la activación proteolítica de la caspasa-4 que conduce a la consecuente apoptosis dependiente de las caspasas-9 y -3.

El estrés de RE ha sido ligado a diversas mutaciones identificadas como las causantes de la ELA familiar, sobre todo a partir del desarrollo de modelos animales que expresan dichas mutaciones, como son las de SOD1 y las de VAPB (Nassif *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2010; Walker y Atkin, 2011).

En pacientes de ELA esporádica se ha descrito que las células del asta anterior de médula espinal presentan un RE rugoso irregularmente distendido con separación de los ribosomas (Oyanagi *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2009), lo que sugiere mecanismos de estrés de RE. A estas alteraciones morfológicas se suman la alteración de la totalidad de la UPR y la activación observada en sus vías de señalización en muestras de médula espinal de pacientes con ELA esporádica (Atkin *et al.*, 2008).

b) Aparato de Golgi

El aparato de Golgi (AG) está compuesto por una serie de cisternas aplanadas, paralelas e interconectadas, organizadas alrededor del centro organizador de microtúbulos en la región perinuclear. El AG es una estructura muy dinámica que juega un importante papel en el transporte, procesamiento y direccionamiento de numerosas proteínas destinadas a secreción, a la membrana plasmática, al RE y a los lisosomas. En las neuronas, el AG está implicado en el flujo axoplásmico de proteínas endógenas y macromoléculas exógenas transportadas por rutas ortógradas, retrógradas y trans-sinápticas, por lo que daños en este orgánulo tienen consecuencias perjudiciales para la función del axón y los terminales presinápticos (Okamoto *et al.*, 2010). Además, se ha observado que durante la muerte apoptótica de la célula, el AG se dispersa y se desensambla en grupos tubulovesiculares (Maag *et al.*, 2003).

La fragmentación del AG ha sido observada frecuentemente en motoneuronas de pacientes con ELA esporádica, familiar y juvenil (Okamoto *et al.*, 2010). Además, se ha constatado que en pacientes con ELA la mayoría de las motoneuronas que contienen inclusiones citoplásmicas exhiben AG fragmentado (Okamoto *et al.*, 2010). Estos hallazgos sugieren que la fragmentación del AG puede estar relacionada con la degeneración neuronal en pacientes de ELA.

1.2.3.8. Alteración de la autofagia en la ELA

En todas las células eucariotas, existen dos sistemas principales para la degradación de proteínas citoplásmicas: el sistema ubiquitina-proteasoma (que degrada principalmente proteínas de vida-corta y mal-plegadas), y la autofagia (que está implicada en el aclaramiento de proteínas de vida-larga y orgánulos) (Ferrucci *et al.*, 2011). La autofagia es un proceso de autodegradación constitutivo que está implicado tanto en el remplazo basal de los componentes celulares como en la respuesta a la escasez de nutrientes. Además es la principal vía de degradación para agregados proteicos intracitosólicos y mitocondrias dañadas (Okamoto *et al.*, 2010).

Tanto la ELA esporádica como la familiar se caracterizan por la patología ultraestructural de las neuronas motoras, los agregados proteicos intraneuronales y el daño mitocondrial que se han descrito anteriormente. Estas alteraciones encajan con el fallo en la eliminación de proteínas y orgánulos de las motoneuronas en la ELA, lo que indica un defecto en la maquinaria de la autofagia como un determinante común en la ELA (Ferrucci *et al.*, 2011). De hecho, se ha detectado un incremento de autofagosomas en neuronas motoras de la médula espinal de pacientes con ELA y en modelos de roedores (Morimoto *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008, Sasaki, 2011). Las alteraciones de la vía autofágica han sido ampliamente estudiadas por diversos autores y han sido propuestas como un mecanismo central en la patogénesis de la ELA (Nassif *et al.*, 2010; Ferrucci *et al.*, 2011; Nassif y Hetz, 2011; Chen *et al.*, 2012).

La autofagia está regulada por una gran familia de genes denominados *atgs*. Diversas señales fisiológicas y nocivas pueden desencadenar la autofagia, como la privación de nutrientes, el estrés de RE, el daño a orgánulos o la inhibición del proteasoma (Nassif *et al.*, 2010). Brevemente, el proceso de autofagia implica la encapsulación de la carga en una vesícula de doble membrana para formar el autofagosoma, que posteriormente se fusiona con lisosomas para constituir el autolisosoma, donde la carga es degradada.

El proceso de la autofagia comienza con la nucleación de un complejo de proteínas para formar la creciente membrana del fagóforo que deriva del RE y/o de la red del trans Golgi (Ferrucci *et al.*, 2011). Después la vesícula se expande y encapsula el material secuestrado que incluye citosol, orgánulos y agregados proteicos, formando la vesícula de doble membrana denominada autofagosoma (figura 6). El núcleo de la maquinaria autofágica se construye alrededor de dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina: ATG12 (que forma un complejo multimérico cuando se activa y se transloca a la membrana del autofagosoma temprano) y la proteína asociada a microtúbulos cadena ligera 3 (LC3 -light chain 3)-I (Nassif *et al.*, 2010). Cuando se inicia la formación del autofagosoma, LC3-I es cortada para disociarla de los microtúbulos y posteriormente es unida a fosfatidiletanolamina (PE), generando LC3-II. LC3-II se redistribuye a la membrana del autofagosoma, conduciendo a la extensión de la misma. Dado que LC3-II es indispensable en este proceso, se usa como estándar para medir los niveles de autofagia (Nassif *et al.*, 2010).

Los autofagosomas se fusionan posteriormente con compartimentos endocíticos como los endosomas, los cuerpos multivesiculares y los lisosomas. Los anfisomas son orgánulos que contienen autofagosomas y constituyentes endosomales. Los anfisomas y los autofagosomas maduran mediante la fusión con lisosomas, formando los autolisosomas en los cuales el material encapsulado es degradado por enzimas hidrolíticas y proteasas (Nassif *et al.*, 2010).

En la regulación de la autofagia existen dos vías principales: mTOR (*mammalian target of rapamycin*) dependiente y mTOR independiente. mTOR es un regulador del crecimiento y la diferenciación celular, de forma que integra la señalización de factores de crecimiento y nutrientes. En presencia de factores de crecimiento y nutrientes abundantes, mTOR reprime la vía autofágica mediante la inhibición del complejo PI3K clase III (Nassif *et al.*, 2010). La activación de la autofagia por privación de nutrientes implica la de-represión de la quinasa de mTOR, que fosforila a mTOR inhibiendo su actividad.

La vía no-canónica de la autofagia (vía mTOR independiente) se inicia por una bajada global de los niveles de inositol trifosfato (IP3). Esta vía es modulada por inositolmonofosfatasas (IMPasas) (Nassif *et al.*, 2010).

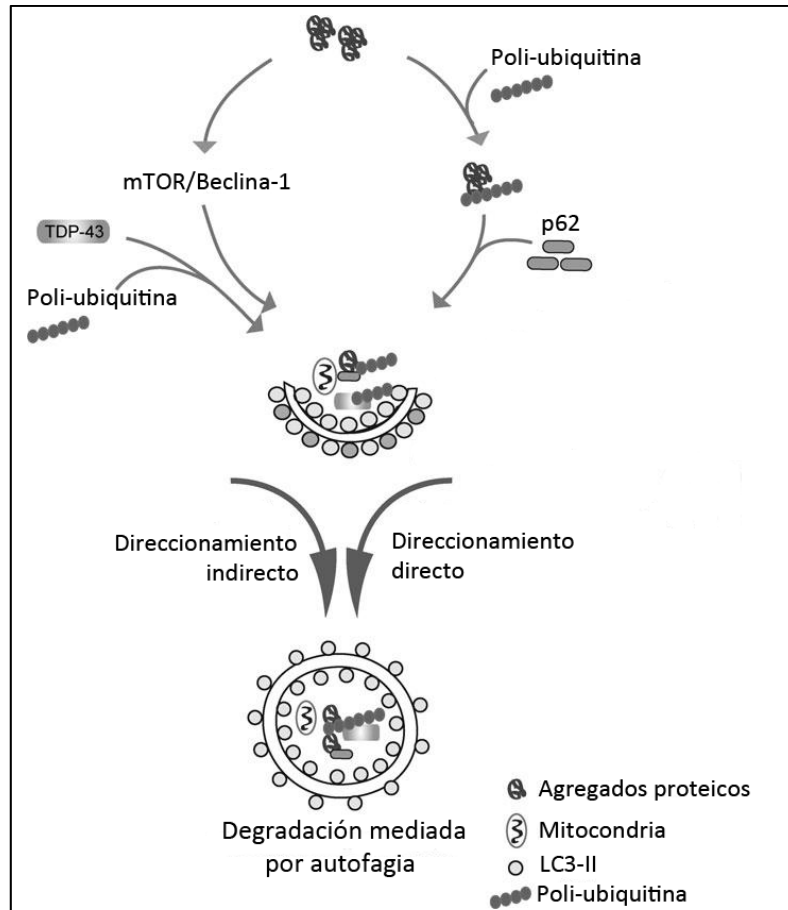


Figura 6: Vía autofágica en la ELA. Los agregados proteicos que se acumulan durante la progresión de la ELA y las diversas alteraciones celulares, activan las vías autofágicas. Dichos agregados así como algunas proteínas cuya función está alterada, como TDP-43, se ubiquitinizan y son dirigidas hacia el autofagosoma por la proteína p62. Adaptado de Nassif *et al.* (2010).

1.2.3.9. Alteración de la neurotransmisión en la ELA

El desarrollo de hiperexcitabilidad es un fenómeno bien conocido en la ELA (Bae *et al.*, 2013). La hiperexcitabilidad sigue un patrón temporal, desarrollándose en los estados iniciales de la enfermedad y desapareciendo gradualmente en estados más avanzados, ligado a la destrucción de las vías corticomotoras.

La hiperexcitabilidad parece desarrollarse de una manera estrechamente relacionada con la integridad dañada de dos componentes diferentes del neocórtex humano, las neuronas de proyección glutamatérgicas (neuronas corticomotoras, excitatorias), y las interneuronas ácido γ -aminobutírico (GABA)-érgicas (inhibitorias) (Bae *et al.*, 2013).

Adicionalmente a este fenómeno, las alteraciones en los niveles de neurotransmisores en enfermos de ELA han sido ampliamente estudiadas. Desde los primeros estudios con muestras de tejido de pacientes con ELA tomadas *post mortem* se detectaron niveles alterados de la actividad glutamato dehidrogenasa (GHD) (implicada en el metabolismo del glutamato), y en los niveles de varios neurotransmisores como el glutamato, el GABA y la taurina (Perry *et al.*, 1987; Malessa *et al.*, 1991).

a) Alteraciones en los niveles de glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de vertebrados y es el aminoácido libre más abundante en el cerebro (Smith, 2000). Bajo condiciones patológicas, la excesiva activación de sus receptores postsinápticos, tanto por el propio glutamato como por otros aminoácidos excitatorios, puede provocar lesiones excitotóxicas iniciando diversos procesos que conducen a la muerte neuronal, como la activación de vías dependientes de calcio y la generación de radicales libres (Smith, 2000; Bae *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que aproximadamente el 40% de los pacientes que padecen ELA tienen concentraciones elevadas de glutamato en el LCR, y que este subgrupo de pacientes coincide con el debut espinal de la ELA, con una función de las extremidades más deteriorada y con una tasa mayor de deterioro muscular (Spreux-Varoquaux *et al.*, 2002). Esta característica ha llevado a pensar que los niveles de glutamato pueden reflejar la intensidad del daño celular en la médula espinal. La citada diferencia en el grupo de pacientes con debut espinal ha sido confirmada también por la detección de niveles elevados de glutamato en plasma (Andreadou *et al.*, 2008) y en pacientes con un desarrollo severo de la enfermedad (Niebroj-Dobosz y Janik, 1999), mientras que los niveles de glutamato en los pacientes con debut bulbar permanecen normales. Estas diferencias entre los dos grupos de pacientes ha generado la hipótesis de que los dos subtipos de ELA pueden ser bioquímicamente diferentes.

b) Alteraciones en el sistema GABAérgico

El neurotransmisor inhibitorio más ampliamente distribuido en el SNC de mamíferos es el GABA (Petri *et al.*, 2006). Las interneuronas GABAérgicas son el 20-25% del total de las neuronas del neocórtex y están interconectadas por uniones estrechas (“gap junctions”) (Bae *et al.*, 2013). Fisiológicamente, la neurotransmisión GABAérgica en el córtex se ha considerado como protector frente al efecto excitatorio de las motoneuronas y, tanto a nivel espinal como cortical, ejerce una función reguladora sobre la excitación de neuronas y sus redes nerviosas.

Varios estudios destacan las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica: se ha documentado el debilitamiento de la transmisión GABAérgica y la reducción de las neuronas inhibitorias en el córtex en pacientes con ELA en comparación con los individuos control (Nihei *et al.*, 1993), y un reciente estudio ha demostrado que existen diferencias en el contenido de GABA en el córtex de estos pacientes (Foerster *et al.*, 2012). Vucic *et al.* (2009) demostraron que la inhibición intracortical de corto intervalo, mediada por las interneuronas inhibitorias, estaba significativamente reducida en ELA, posiblemente por la pérdida de interneuronas.

Además, se han descrito varias alteraciones en las neuronas corticomotoras que podrían afectar su susceptibilidad al GABA. Se ha encontrado una reducción de los niveles de expresión de ARNm de la subunidad $\alpha 1$ del receptor pentamérico GABA-A de GABA (Petri *et al.*, 2010). Este hecho tiene una gran relevancia dado que la composición de las de los receptores-canales define sus propiedades fisiológicas y farmacológicas.

En esta línea, Brockington *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio sistemático para comprobar las diferencias en la expresión genética y la conductividad de distintos receptores entre neuronas vulnerables y neuronas resistentes a la patología de la ELA (en el núcleo de Onuf y los núcleos oculomotores). Sus resultados revelaron que la baja susceptibilidad a la excitotoxicidad se debe en parte a una transmisión GABAérgica aumentada con respecto a las neuronas más susceptibles (Brockington *et al.*, 2013).

c) Papel de la Taurina

La taurina (ácido 2-amino-etanesulfónico) es un aminoácido libre que se encuentra abundantemente en mamíferos, principalmente en tejidos excitables como el cerebro, la retina y los músculos (Menzie *et al.*, 2014). En el SNC la taurina está implicada en gran cantidad de procesos, como la neuromodulación, la osmorregulación, el mantenimiento de la homeostasis del calcio, la estabilización de membrana, funciones antioxidantes, procesos antiinflamatorias y neuroprotección (Menzie *et al.*, 2014). Las rutas moleculares de actuación de la taurina en el SNC ha sido profundamente estudiadas (Wu y Prentice, 2010).

Aunque la taurina no ha sido clasificada definitivamente como un neurotransmisor, numerosos hechos apoyan esta denominación, como su acción como modulador de la transmisión nerviosa y las pruebas que apuntan a la existencia de un receptor específico para este aminoácido (Menzie *et al.*, 2014).

El papel más importante de la taurina en los procesos neurodegenerativos es su protección frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato. La secuencia de eventos por los que la taurina ejerce su función neuroprotectora se resume como sigue (Wu y Prentice, 2010):

- a) La taurina reduce la elevación de calcio intracelular inducida por glutamato mediante la inhibición del influjo de calcio desde varios canales.
- b) La taurina inhibe canales de calcio dependientes de voltaje y la liberación de calcio desde los reservorios internos, posiblemente mediante la inhibición de la fosfolipasa C.
- c) La taurina inhibe la activación de la calpaina inducida por glutamato y la subsecuente activación de la vía apoptótica intrínseca.

Finalmente, aunque el papel de la taurina como neuroprotector ha sido demostrado en desórdenes neurodegenerativos, no existen muchas evidencias de su papel en la ELA aparte de las alteraciones en sus niveles. Pero recientemente, se ha demostrado que existe un incremento del transportador de taurina (TauT) dependiente de la edad

en un modelo de ratón transgénico SOD1 de ELA y en motoneuronas espinales de pacientes con ELA (Jung *et al.*, 2013). Este aumento de TauT contribuye directamente al aumento de la absorción de taurina en motoneuronas en la ELA.

1.3. Alteración de marcadores de neurodegeneración

1.3.1. Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)

La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) es una serina-treonina quinasa cuya función fue descrita por primera vez en relación con el metabolismo del glucógeno (Salcedo-Tello *et al.*, 2011). Esta quinasa controla muchas funciones neuronales incluyendo el crecimiento de neuritas, la formación de sinapsis, la neurotransmisión y la neurogénesis (Cole, 2012). Está implicada en numerosas funciones mediante la fosforilación de substratos implicados en la transcripción genética, el metabolismo, la apoptosis, la dinámica del citoesqueleto, la transducción de señales, la dinámica de los lípidos de membrana y el tráfico vesicular entre otros (Cole, 2012). Por otra parte, GSK3 regula algunas vías de transducción de señales, como la señalización mediada por factores de crecimiento a través de Akt, que influye en la supervivencia celular en el cerebro (Cole, 2012, Valvezan y Klein, 2012). Así, se observa que una inhibición prolongada de GSK3 está asociada con un elevado crecimiento celular, mientras que la activación se asocia con la neurodegeneración (Salcedo-Tello *et al.*, 2011).

Existen dos isoformas distintas de GSK3, GSK3 α y GSK3 β , que son codificadas por genes independientes. Ambas se expresan ampliamente en todos los tejidos con niveles particularmente altos en el cerebro, donde se encuentra una isoforma específica de las neuronas GSK3 β 2 (Salcedo-Tello *et al.*, 2011). La regulación de GSK3 es especialmente compleja dado que es una enzima constitutivamente activa. Su actividad es regulada por su nivel de fosforilación, por su localización celular y por proteólisis regulada (Salcedo-Tello *et al.*, 2011).

Aunque GSK3 es una enzima principalmente citosólica, también está presente en el núcleo y la mitocondria, donde está altamente activada en comparación con la porción citosólica (Bijur. y Joep, 2003). La localización de GSK3 determina el rango de proteínas diana sobre las que puede actuar (Joep y Johnson, 2004). Así, cuando GSK3 está en el

núcleo regula la transcripción de diversos genes mediante la fosforilación de varios factores de transcripción. Se requiere un control fino de la activación y la inhibición mediada por GSK3 para asegurarse el balance adecuado entre morforegulación, proliferación y crecimiento (Salcedo-Tello *et al.*, 2011).

Varias vías de señalización controlan el nivel de actividad de GSK3 por fosforilación. La fosforilación de la Tyr216/279 es necesaria para la activación de la enzima, mientras que la fosforilación de la Ser9/21 (GSK3 β /GSK3 α respectivamente) resulta en la inhibición de la actividad quinasa (Salcedo-Tello *et al.*, 2011).

El estudio de GSK3 es de especial relevancia en relación con diversas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativa, ya que ha sido implicado en el balance entre la apoptosis y la supervivencia celular. La sobreexpresión de GSK3 induce apoptosis en células en cultivo (Pap y Cooper, 1998; Bijur *et al.*, 2000) y en el cerebro de ratones (Lucas *et al.*, 2001), mientras que su inhibición ha sido estudiada como protectora frente a diferentes tipos de estrés ambiental (revisado por Mines *et al.*, 2011).

Como un objetivo crucial en la mediación de una variedad de procesos neuronales, GSK3 se propone como una diana terapéutica para la restauración de la función sináptica, particularmente en la enfermedad de Alzheimer (Salcedo-Tello *et al.*, 2011; Cole, 2012; Jope y Johnson, 2004). Así, los inhibidores de GSK3 representan una promesa como agentes modificadores de la neurodegeneración en el Alzheimer (Martínez *et al.*, 2011). También se ha encontrado una estrecha relación entre la enfermedad de Parkinson y la actividad y localización subcelular de GSK3 (Gong *et al.*, 2012). Respecto a la ELA, la expresión de GSK3 β aparece regulada al alza y se encuentra asociada con depósitos intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada (Yang *et al.*, 2008). Esto sostiene el potencial papel de GSK3 β como diana terapéutica para los pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica.

1.3.2. Proteína de unión al DNA TAR-43 (TDP-43)

Numerosos estudios en varios desórdenes neurodegenerativos, han confirmado que la presencia de inclusiones anormales tanto en las neuronas como en la glía, compuestas por la proteína de unión al ADN TAR-43 (TDP-43), son su principal rasgo neuropatológico (Neumann *et al.*, 2009). Dichos desórdenes pueden incluirse bajo el término proteinopatías de TDP-43. Esta proteína es el principal componente de las inclusiones ubiquitina-positivas encontradas en el cerebro de pacientes con ELA (Nonaka *et al.*, 2009).

TDP-43 es una proteína nuclear de 414 aminoácidos codificada por el gen TARDBP en el cromosoma 1, que fue identificado inicialmente como el gen que codificaba la proteína de 43 kDa que se unía a la secuencia de ADN de respuesta de transactivación (TAR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 (Geser *et al.*, 2009).

Esta proteína se expresa ubicuamente en muchos tejidos, incluyendo en el SNC donde está presente en el núcleo de neuronas y glía y, en menor proporción, en el citoplasma (Geser *et al.*, 2009). Sus rasgos más importantes son la presencia de dos motivos altamente conservados de reconocimiento de ARN (RRM1 y RRM2), una cola C-terminal con una región rica en glicina que media interacciones proteína-proteína, una secuencia de localización nuclear (SLN) y una secuencia de exportación nuclear (SEN) (Igaz *et al.*, 2009). Por lo tanto, TDP-43 es una proteína de unión al ADN/ARN, que también interacciona con otras proteínas nucleares, y está implicada en la represión de la transcripción genética, la regulación del “*splicing*” de exones y las funciones de los cuerpos nucleares (Igaz *et al.*, 2009).

En condiciones patológicas como la ELA, los agregados de TDP-43, ubiquitinada y con el N-terminal truncado, se puede aislar de tejido nervioso rico en inclusiones citoplásmicas (Zhang *et al.*, 2009). En numerosos estudios se resalta la importancia de fragmentos C-terminales (FCTs) de TDP-43, de entre 22-25 kDa, producidos por el corte anormal llevado a cabo por caspasas (Geser *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), puesto que la acumulación de dichos fragmentos conduce a la formación de inclusiones citoplásmicas tóxicas, insolubles, ubiquitinadas y fosforiladas (Zhang *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que TDP-43 posee numerosos residuos susceptibles de fosforilación y que es fosforilado de forma anormal en los residuos 379, 403, 404, 409, y 410 en casos de ELA y FTLD (Hasegawa *et al.*, 2008; Inukai *et al.*, 2008), por lo que se han desarrollado anticuerpos anti pS409/410 para detectar esta fosforilación anormal. Gracias a ello, se ha comprobado que los FCTs de TDP-43 son más propensos a la fosforilación que el TDP-43 completo, aunque esta fosforilación no es necesaria para su agregación (Zhang *et al.*, 2009).

En resumen, los FCTs de TDP-43 participan en los mecanismos patológicos mediante tres puntos principales: el corte de TDP-43 es un prerrequisito para la hiperfosforilación, agregación y toxicidad detectadas en el tejido nervioso de pacientes con ELA (Zhang *et al.*, 2009); el corte de TDP-43 por caspasas resulta en la redistribución del TDP-43 del núcleo al citoplasma, posiblemente por la pérdida de NLS, lo que puede implicar una pérdida de función (Zhang *et al.*, 2007); los FCTs pueden afectar la función normal de TDP-43, como la interacción con miembros de la familia hnRNP de factores de “*splicing*” (Igaz *et al.*, 2009).

1.4. Modelos animales de ELA

Existen varios modelos de ELA con animales transgénicos que recapitulan algunas características de esta enfermedad. Se han desarrollado al menos 13 líneas de ratón transgénico que expresan proteínas SOD1 humanas ligadas a la ELA familiar, incluyendo mutantes enzimáticamente activos e inactivos, y mutantes con el C-terminal truncado y deficientes en metales (Turner y Talbot, 2008), aunque también existen otros modelos transgénicos centrados en la mutación de proteínas diferentes, como el ratón wobbler (Boillèe *et al.*, 2003). El modelo de ratón transgénico SOD1G93A fue de los primeros en desarrollarse y actualmente es de los más estudiados (Walker y Atkin, 2008). Recientemente también se han desarrollado modelos transgénicos en rata centrados también en la mutación de SOD1G93A (que afecta a la dismutación de la SOD1) y en la mutación H46R (que afecta al dominio de unión del Cobre en el sitio catalítico de la enzima) (Nagai *et al.*, 2001).

A pesar de que estos modelos de roedores desarrollan varias de las características neuropatológicas de la ELA (como la denervación muscular, la activación astrogial y microglial y la pérdida de motoneuronas), queda por demostrar que los hallazgos obtenidos en el modelo mutante de SOD sean también aplicables a otras formas de ELA familiar o esporádica (Robberecht y Philips, 2013). En particular, el modelo de ratón que sobre-expresa SOD1 mutada humana, ha sido criticado por su pobre valor predictivo en términos de terapias potenciales. El problema principal que plantean estos modelos genéticos es el corto periodo que transcurre desde la aparición de los primeros síntomas motores (afectación uni o bilateral de las extremidades traseras) hasta la muerte del animal, aproximadamente 34 días en el caso del ratón SOD1G93A (Gurney *et al.*, 1994), 8 días en el caso de la rata SOD1G93A y 25 días en el caso de la rata SOD1H46R (Nagai *et al.*, 2001). A causa de este corto periodo de tiempo, la mayoría de los ensayos con fármacos se inicia antes de que debute la enfermedad, por lo que se plantean dudas sobre su efectividad en pacientes en los que la enfermedad se diagnostica cuando ya han aparecido síntomas claros como la pérdida de la capacidad motora y cuyo tratamiento se inicia meses o incluso años después de la aparición de la debilidad.

Cabe resaltar que aunque la mayoría de los casos de ELA son esporádicos (aproximadamente 90% de los casos), hasta el momento sólo existen modelos animales genéticos que expresan las mutaciones relacionadas con la ELA familiar.

Siguiendo la línea de la hipótesis del L-BMAA, varios autores han examinado los efectos de la intoxicación con este aminoácido en diversas especies animales y con distintos tipos de dosificación, obteniendo diferencias sustanciales en sus resultados. Gran parte de estos estudios fueron recopilados en una excelente revisión llevada a cabo por Karamyan y Speth (2008). Actualmente, hemos ampliado estos datos con la revisión bibliográfica realizada para llevar a cabo esta memoria, tal y como se describe en la tabla 1.

Referencia	Animales	Tratamiento con L-BMAA	Resultados
Bell <i>et al.</i> (5th Cypad conference, 1967) (Whiting, 1988)	Polluelos (40 g)	0,2-0,8 g/kg i.p.	Incapacidad para extender las patas y estar de pie
Vega <i>et al.</i> (1968)	Polluelos (45 g)	0,3-0,8 g/kg i.p.	Incapacidad para extender las patas y estar de pie
	Ratas (60 g)	0,7-1,6 g/kg i.p.	Deambulaci3n arrastrando las patas, debilidad y convulsiones
Polsky <i>et al.</i> (1972)	Polluelos (45 g)	0,4-0,8 g/kg i.p.	Incapacidad para extender las patas y estar de pie
	Ratas (66 g)	0,8-1,7 g/kg i.p.	Deambulaci3n arrastrando las patas, debilidad y convulsiones
	Ratones (35 g)	2,5-3,3 g/kg i.p.	Deambulaci3n arrastrando las patas, debilidad y convulsiones
Ross y Spencer (1987)	Ratones (37 g)	0,3-1 mg i.c.v.	Estado hiperexcitable, temblor de todo el cuerpo
Spencer <i>et al.</i> (1987 a, b)	Monos (2.3 kg)	0,1-0,3 g/kg/día oral, durante más de 12 semanas	Desorden del sistema motor muy similar al ALS/PDC
Perry <i>et al.</i> (1989)	Ratones (~30 g)	~0,5 g/kg/day oral, > 11 semanas	Sin cambios de comportamiento, neuroquímicos o neuropatológicos
Seawright <i>et al.</i> (1990)	Ratas (85 g)	0,5-4 g/kg i.p.	Ataxia, dificultad para caminar, daño cerebelar selectivo
Smith y Meldrum (1990)	Ratones (23 g)	0,08–1,5 mg i.c.v.	Ataxia, deambulaci3n inestable y ondulante, sacudidas mioclónicas
Lindstrom <i>et al.</i> (1990)	Ratas (200 g)	0,4 mg intracisternalmente y dentro de la sustancia nigra	1 semana postratamiento (cuando no hay déficits neurológicos) se observó la lesi3n selectiva de la sustancia nigra
Rakonczay <i>et al.</i> (1991)	Ratas (250 g)	0,5 mg/día i.c.v., 16-60 días	Separaci3n de las patas traseras, rigidez, movimientos involuntarios, sacudidas del cuerpo, cambios en los sistemas glutamatérgico y colinérgico.
Matsuoka <i>et al.</i> (1993)	Ratas (250 g)	0,5 mg/día i.c.v., durante 10 días	Separaci3n de las patas traseras, rigidez, movimientos involuntarios, sacudidas del cuerpo, implicaci3n de los receptores glutamatérgicos.
Chang <i>et al.</i> (1993)	Ratas (155 g)	1,5 µg i.c.v.	Separaci3n de las patas traseras, movimientos de lado a lado, descenso en el número de receptores glutamatérgicos.
Dawson <i>et al.</i> (1998)	Ratas neonatas	0,1-0,5 g/kg s.c., DPN 2 y 5	Algunos cambios dependientes del tratamiento y del sexo en la funci3n motora y la neuroquímica de la médula espinal no relacionados con el ALS/PDC
Cruz-Aguado <i>et al.</i> (2006)	Ratones (39 g)	1 mg/día oral (28 mg/kg), > 30 días	Sin cambios de comportamiento o neuropatológicos
Santiago <i>et al.</i> (2006)	Ratas (320 g)	Perfusi3n intraestriatal por microdiálisis	Daño aparente de los terminales dopaminérgicos (no queda claro si causado por el L-BMAA)
Buenz y Howe (2007)	Ratones (~30 g)	15,5µg intraestriatal	Daño específico en el hipocampo (regi3n CA1) 24 h postratamiento.
Karlsson <i>et al.</i> (2009 a)	Ratas neonatas	0,2-0,6 g/kg s.c., DPN 9 y 10	Disfunci3n en el aprendizaje a largo plazo. Sin alteraci3n en el funcionamiento del eje hipotalámico-pituitario-adrenal.

Referencia	Animales	Tratamiento con L-BMAA	Resultados
Karlsson <i>et al.</i> (2009 b)	Ratones gestantes	7,3 µg/kg i.v., DG 14	Transferencia transplacentaria de ³ H-BMAA y absorción significativa por el cerebro fetal del ratón
	Ratones neonatos	7,3 µg/kg s.c., DPN 10	Radiactividad localizada específicamente en el hipocampo, el estriado, el tronco encefálico, la médula espinal y el cerebelo.
	Ratas neonatas	0,2-0,6 g/kg s.c., DPN 9 y 10	Alteraciones agudas del comportamiento, como habilidad locomotora dañada e hiperactividad. Fallo en la habituación al ambiente con la dosis más alta.
Purdie <i>et al.</i> (2009)	Larvas de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Exposición a 10 µg/l durante 10 días	Convulsiones clónicas, formación anormal del eje espinal, incremento de la mortalidad
	Artemia (<i>Artemia salina</i>)	Exposición a 0,05-5000 µg/l	Incremento de la mortalidad, pérdida de la respuesta fototáctica
	Protozoo <i>Nassula sorex</i>	Exposición a 0,05-5000 µg/l	Incremento de la mortalidad
Santucci <i>et al.</i> (2009)	Ratones adultos	Inyección intravítrea de 1 µl de L-BMAA (5-10 nmol)	Muerte de las células de la retina, con activación de caspasa-3, incorporación de loduro de propidio y producción de ROS.
Zhou <i>et al.</i> (2009) (2010)	Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Medio de alimentación con una concentración final de L-BMAA 4 mM, 7 días	Reducción del periodo de vida, de la función locomotora y de las habilidades de aprendizaje y memoria. Acumulación de L-BMAA tanto libre como unido a proteínas.
Goto <i>et al.</i> (2012)	Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Medio de alimentación con una concentración final de L-BMAA 25 mM	Apertura del receptor NMDA por periodos prolongados de tiempo provocando daños excitotóxicos. Posterior afectación motora.
Karlsson <i>et al.</i> (2011)	Ratas neonatas	50, 200 o 600 mg/kg s.c. DPN 9 y 10	Déficits en el aprendizaje espacial y de memoria cuando son adultas. Muerte neuronal en el hipocampo 24 h tras la dosis más alta y en áreas específicas de corteza implicadas en la función cognitiva.
Karlsson <i>et al.</i> (2012)	Ratas neonatas	50, 200 o 600 mg/kg s.c. DPN 9 y 10	A los 6 meses de edad, cambios a largo plazo en la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo energético en el hipocampo. Daño hipocampal severo con la dosis más alta, así como cambios en la expresión de histonas, proteínas que unen calcio-calmodulina y nucleótidos de guanina.
Karlsson <i>et al.</i> (2013 a, b)	Ratas neonatas	50, 200 o 600 mg/kg s.c. DPN 9 y 10	Cambios a largo plazo en proteínas y en los niveles de varios péptidos relacionados con el desarrollo y la supervivencia de las neuronas.
Engskog <i>et al.</i> (2013)	Ratas neonatas	50, 200 o 600 mg/kg s.c. DPN 9 y 10	Cambios en metabolitos relacionados con el metabolismo energético y el metabolismo de aminoácidos (d-glucosa, lactato, 3-hidroxibutirato, creatina y acetato).

Referencia	Animales	Tratamiento con L-BMAA	Resultados
Okle <i>et al.</i> (2013)	Abejas (<i>Apis mellifera</i>)	Medio de alimentación con una concentración final de L-BMAA 5 mM	Aumento de la mortalidad y habilidad reducida para aprender olores en un paradigma de condicionamiento clásico
Xie <i>et al.</i> (2013)	Ratones C57/BL (12 semanas)	3,8 mg/kg i.v.	Marcaje denso dentro de los ventrículos, los plexos coroideos y la materia gris completa. Incorporación del L-BMAA en las proteínas cerebrales.
Karlsson <i>et al.</i> (2014)	Ratas neonatas	0,68 mg/kg s.c. DPN 10	Incorporación de L-BMAA en proteínas en el cerebro y el hígado.

Tabla 1: Resumen de los estudios *in vivo* de intoxicación con L-BMAA, realizados con distintas especies animales. *i.p.*: intraperitoneal; *i.c.v.*: intra-cerebro ventricular; *s.c.*: subcutánea; *i.v.*: intravenosa; *DG*: día de gestación; *DPN*: día posnatal.

Los primeros estudios fueron llevados a cabo por el grupo de Spencer en ratones y primates no humanos (Nunn *et al.*, 1987; Ross y Spencer, 1987; Spencer *et al.*, 1987 a, b). Aunque se describieron diversos síntomas motores, las altas dosis usadas fueron fuertemente criticadas y los síntomas en primates fueron sólo agudos o subagudos.

Desde entonces, diversos grupos han investigado los efectos neurotóxicos del L-BMAA mediante la administración *in vivo* de esta toxina en varias especies animales, desde estudios con invertebrados hasta primates, para comprobar sus posibles efectos sobre el sistema motor y constatar las alteraciones que provoca este aminoácido neurotóxico. Dependiendo del objetivo de cada grupo experimental, se han probado varias vías de administración: vía oral para comprobar la acumulación del L-BMAA en la cadena trófica, vía intraperitoneal o subcutánea para constatar los efectos fisiopatológicos generales sobre el organismo, vía intracerebral para estudiar sus efectos sobre áreas específicas del sistema nervioso, etc.

Los relevantes descubrimientos sobre el origen del L-BMAA en las raíces de *Cycas* y sobre los mecanismos bioquímicos que desencadena este neurotóxico (la bioacumulación, la liberación lenta y la subestimación inicial de su concentración en tejidos que ya se han comentado) volvieron a dar fuerza a las investigaciones sobre el posible papel de este compuesto en la patogénesis de la ELA, para intentar mimetizar los síntomas fisiopatológicos observados en el ALS-PDC.

A pesar de los diversos estudios sobre la toxicidad y los efectos del L-BMAA realizados, aún no se ha conseguido establecer un modelo animal de ELA esporádica que sea fácilmente reproducible y que manifieste la aparición progresiva de la enfermedad. Por este motivo es necesaria una investigación más profunda con el fin de conseguir un modelo animal útil, tanto para conocer y establecer más datos referentes a esta patología, como para proporcionar una herramienta de gran ayuda en el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas para el tratamiento de la ELA.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los modelos animales constituyen herramientas básicas para el estudio fisiopatológico de distintas enfermedades humanas y para probar la efectividad de nuevas moléculas con posible capacidad terapéutica. En la actualidad no existe un modelo validado para el estudio de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) esporádica. Desde hace décadas se baraja la hipótesis de que el aminoácido β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) es uno de los principales factores causantes de la aparición de esta enfermedad neurodegenerativa. El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de un modelo *in vivo* de ELA esporádica en ratas mediante la administración de L-BMAA.

Para conseguir este propósito se abordan los siguientes objetivos concretos:

- Elección de un sistema de administración de L-BMAA reproducible, del momento de inicio del tratamiento, de la duración del mismo y de las dosis más adecuadas para conseguir síntomas semejantes a la ELA. Por otro lado, se valorará la presencia del L-BMAA en suero para estudiar cómo varía la concentración de este aminoácido en sangre tras su administración.
- Elección de una batería de pruebas que permitan estudiar el estado de afectación motora de los animales y con ellas elaborar una escala de evaluación neurológica. Además, se seleccionarán una serie de pruebas estándar para valorar la funcionalidad y el control motores.
- Comprobación del estado fisiológico de los animales, estableciendo si la administración del L-BMAA tiene efectos sobre el desarrollo general y sobre el hígado y el riñón, principales órganos de detoxificación del organismo.
- Realización de análisis morfométricos por imagen de resonancia magnética (IRM) para el estudio de las posibles alteraciones en el volumen muscular de las extremidades traseras, de la corteza motora y de los ventrículos cerebrales. Así mismo, se analizará la alteración de núcleos bulbares relacionados con la sintomatología de la ELA.

- Estudio por espectroscopia ^1H RMN *High Resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS) de metabolitos relacionados con procesos neurodegenerativos.
- Realización de análisis ultraestructural del estado de las neuronas en corteza motora y médula espinal lumbar, así como de análisis inmunohistoquímicos para estudiar los procesos de autofagia y muerte celular.
- Estudio de las posibles alteraciones en los niveles de diferentes neurotransmisores como el Glutamato, el GABA y la Taurina.
- Análisis de biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas: niveles GSK3 β , total y fosforilado, y la presencia de agregados y formas aberrantes de TDP-43.
- Realización de ensayos de neuroprotección para testar la molécula potencialmente terapéutica VP2.51, una vez establecidas las características del modelo animal de ELA esporádica en rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Los ensayos se llevaron a cabo usando ratas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza Wistar que fueron proporcionadas por Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron a una temperatura constante ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) en un ciclo invertido de luz/oscuridad (encendido de las luces a las 20:00 h), con dieta y agua *ad libitum* (dieta comercial para roedores A04; Panlab, Barcelona, España). Los ensayos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

3.2. Tratamiento con L-BMAA

La forma de administrar el L-BMAA (L-BMAA *hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Ref. B107), se fijó para conseguir que el tratamiento fuera lo menos agresivo posible para los animales y fácilmente reproducible. Por lo tanto, se descartaron las inyecciones intravenosas e intracerebro-ventriculares, eligiéndose finalmente la inyección intraperitoneal (i.p.).

Diversos datos en la literatura confirman la aparición de déficits neurológicos en ratas mediante la administración i.p. de L-BMAA (Vega *et al.*, 1968; Polsky *et al.*, 1972; Seawright *et al.*, 1990). Las dosis y el periodo de administración se eligieron siguiendo una revisión de los trabajos de los autores mencionados anteriormente, en los cuales una sola dosis de L-BMAA (entre 700 y 4000 mg/kg) provocaba efectos neurológicos agudos, mientras que dosis crónicas de 500 mg/kg por día durante varios días producían un efecto acumulativo conduciendo a la intoxicación (Seawright *et al.*, 1990). En nuestro estudio se ha optado por dosis inferiores a las utilizadas por estos investigadores, y se han ensayado distintas edades y periodos de tratamiento para elegir la administración de L-BMAA que consiga un daño neurológico crónico y progresivo, evitando en la medida de lo posible los efectos agudos y transitorios.

Para su administración por inyección i.p. a los animales, el L-BMAA se disolvió en tampón fosfato salino (PBS), suministrando un volumen similar de PBS a los animales control.

Para preservar el desarrollo normal del sistema nervioso, no se iniciaron los tratamientos antes del destete, el día posnatal 21 (con animales de un peso aproximado de 50 g). Se administraron distintas dosis entre los 50 a los 600 mg/kg/día que se resumen en la tabla 2. El número de ratas por grupo no fue nunca menor de 10, considerando machos y hembras por separado.

Dosis i.p. de L-BMAA	Sexo	Edad
50 mg/kg/día 5 días consecutivos	Machos	21 días
	Hembras	21 días
100 mg/kg/día 5 días consecutivos	Machos	21 días
	Hembras	21 días
200 mg/kg/día 5 días consecutivos	Machos	21 días
	Hembras	21 días
250 mg/kg/día 5 días consecutivos	Machos	21 días
	Hembras	21 días
300 mg/kg/día 5 días consecutivos	Machos	21 días
	Hembras	21 días
600 mg/kg/día 5 días consecutivos	Machos	21 días
	Hembras	21 días
200 mg/kg/día 5 días consecutivos	Machos	1 mes
200 mg/kg/día 10 días consecutivos	Machos	21 días

Tabla 2: Resumen de tratamientos en el que se muestran las dosis administradas, el sexo y la edad de los animales tratados.

3.3. Control ponderal

Con el fin de analizar los posibles efectos del L-BMAA sobre el desarrollo físico normal de las ratas, se observó periódicamente el peso de los animales controles y tratados durante y después de cada tratamiento, hasta el momento del sacrificio.

3.4. Evaluación Neurológica

Tras los tratamientos, se llevó a cabo la evaluación neurológica de los animales para comprobar la progresión de los individuos tratados con respecto a controles de la misma edad. Para llevar a cabo esta tarea, se desarrolló una escala de evaluación neurológica en nuestro laboratorio, apropiada para estimar la aparición y evolución de los síntomas en animales tratados con L-BMAA. Esta escala se elaboró tomando como valor 0 de referencia el comportamiento motor normal de los animales control, y como

valor máximo de afectación de 10, la pérdida total de funcionalidad de las extremidades traseras y del control postural. Los niveles de la escala (resumidos en la tabla 3) se han descrito mediante la observación del empeoramiento de los síntomas en los individuos de los distintos grupos tratados (de Munck *et al.*, 2013).

La evaluación se realiza mediante un estudio ciego en el cual los investigadores que evalúan no saben qué animal está siendo observado, control o tratado. La progresión de los animales, tanto controles como tratados, fue observada semanalmente desde el final del tratamiento hasta el sacrificio de los mismos. La evaluación del estado neurológico se determinó usando tres pruebas:

- Observación de la deambulación: se evalúa el control postural del animal así como la forma de apoyo de la planta de las extremidades traseras durante la deambulación. Este test se lleva a cabo introduciendo a la rata en el interior de un corredor de 20 × 20 × 100 cm.
- Test de suspensión por la cola: se suspende al animal, a unos 10 cm de la superficie, agarrándolo por la cola. Se evalúa la capacidad que tiene para mantener las patas traseras en “T” (posición normal que adoptan los roedores en esta postura), así como la rigidez de las mismas y la coordinación del pataleo.
- Test de fuerza: se coloca al animal sobre una superficie plana con las cuatro patas apoyadas y se tira ligeramente de la cola en el sentido contrario al avance. Se observa la capacidad del animal para oponer resistencia y para mantener las extremidades traseras bajo el cuerpo, sin que se abran hacia los lados.

Estas pruebas no tienen la misma contribución al nivel de evaluación final que asignan los investigadores. El test de suspensión por la cola es el que tiene más peso, representando un 70% de la evaluación total, mientras que las otras dos pruebas se usan para afinar el valor, con una importancia de un 15% cada una.

	Deambulaci3n	Suspensi3n de por la cola	Test de fuerza
0	Apoyan toda la planta de las patas traseras cuando deambulan a una velocidad normal.	Posici3n en T de las patas traseras, pataleo coordinado. Tendencia a subir hacia la cola girando de forma lateral al eje principal del cuerpo.	Las patas traseras permanecen bajo el cuerpo o muy cercano a 3l. Responden al est3mulo del tir3n desde la cola oponiendo resistencia
1~2		P3rdida progresiva de la posici3n en T.	
3		No son capaces de describir la T con las patas traseras. Inicio de pataleo descoordinado.	
4	No apoyan toda la planta, deambulan de puntillas.		
5		Estiran las patas hacia atr3s (posici3n caudal)	Al tirar de la cola, abren las patas traseras y progresivamente pierden la respuesta de resistencia.
6	Al girar dejan las patas debajo del cuerpo (lenta correcci3n de la postura).	Descoordinaci3n en las patas traseras en el pataleo.	
7	Mala postura (alteraci3n del control postural), lateralizaci3n.	Al relajar las patas traseras quedan muy cerradas hacia la parte delantera del cuerpo.	Ausencia de resistencia (p3rdida de fuerza). Apertura de las patas traseras.
8	Las patas traseras no responden correctamente al deambular (se deslizan sobre la superficie).	Tendencia a agarrarse las patas traseras entre s3 y a intentar agarrarse a la cola girando hacia la parte delantera del cuerpo.	Apertura de las patas traseras por fuera de la silueta corporal m3s patente.
9	P3rdida de la coordinaci3n en la deambulaci3n, lateralizaci3n marcada.		Curvatura anormal de la espalada durante el test, clara lateralizaci3n y falta de fuerza en los cuartos traseros.
10	P3rdida total del control motor de las patas traseras.		Falta total de fuerza en las patas traseras.

Tabla 3: *Escala de evaluaci3n neurol3gica. Se describe la evoluci3n de los s3ntomas en cada una de las pruebas realizadas.*

Las pruebas de evaluaci3n neurol3gica se realizaron a todos los grupos durante 100 d3as postratamiento, excepto a un grupo de machos tratados al destete con 300 mg/kg/d3a durante 5 d3as consecutivos, cuya evoluci3n se observ3 a m3s largo plazo (14 meses).

3.5. Análisis de los efectos del L-BMAA sobre el estrés oxidativo en el hígado y el riñón

Existe poca información sobre el metabolismo del L-BMAA y sus posibles efectos sobre el estado general del organismo. Nunn y Ponnusamy (2009) descubrieron que el L-BMAA es convertido a metilamina en preparados de hígado y riñón de rata. Dado que la administración crónica de metilamina en rata provoca estrés oxidativo, la conversión del L-BMAA podría estar causando daño por estrés oxidativo en el hígado y el riñón de las ratas tratadas con esta toxina en nuestro estudio (de Munck *et al.*, 2012).

Por este motivo, se ha investigado el efecto del L-BMAA en la respuesta al estrés oxidativo en el hígado y el riñón de ratas tratadas con esta toxina. Como indicadores de estrés oxidativo, se han analizado biomarcadores de la oxidación de lípidos como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el glutatión reducido total (GSH) entre otros (Mayne, 2003).

Así mismo se ha realizado un análisis bioquímico de distintos parámetros hepáticos para comprobar el estado fisiológico de este órgano ya que es el principal encargado de la detoxificación de los xenobióticos en el organismo.

Para la realización de este ensayo se utilizaron machos y hembras tratados al destete con 250 mg/kg/día de L-BMAA durante 5 días consecutivos, y sus respectivos controles. A los 6 meses postratamiento, con una evaluación neurológica no inferior a 7, los animales controles y tratados fueron sacrificados mediante anestesia inhalada (isoflurano (Isoba[®]vet, Schering-Plough, S.A.) al 4% en un flujo constante de oxígeno), extirpándose rápidamente el hígado y los riñones que se conservaron a -80°C hasta la realización de los análisis.

3.5.1. Análisis del perfil hepático

Para estudiar el perfil hepático se analizaron una serie de parámetros bioquímicos que están relacionados con la funcionalidad hepática. Todos estos parámetros fueron medidos en homogenizados de hígado con kits comerciales de SPINREACT (BIO ANALITICA S.L., Madrid). Los parámetros analizados fueron:

- Albúmina: kit colorimétrico de Bromocresol, utilizado según las indicaciones del fabricante.
- Colesterol y triglicéridos: tests enzimáticos colorimétricos basados en la reacción de Trinder (Trinder, 1969), es decir, la condensación de 4-aminoantipyrina con fenol en presencia de H_2O_2 y peroxidasa para producir el colorante rojo quinonimina.
- Contenido proteico: se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Además, se estimaron los niveles de actividad de varias enzimas que se usan habitualmente como marcadores para comprobar la funcionalidad del hígado:

- Las actividades fosfatasa alcalina (ALP) y fosfatasa ácida (ACP) fueron ensayadas en homogenizados de hígado siguiendo el método p-nitrofenol (Kuftinec y Miller, 1972). Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenil fosfato (p-NPP) en p-nitrofenol, un producto de color amarillo que aumenta la absorbancia a 405 nm. Ambas enzimas catalizan esta reacción a distinto pH: la ALP a pH 10,2 y la ACP a pH 5. Las fosfatasas pertenecen al grupo de las enzimas hidrolasas e intervienen en la formación de productos metabólicos más fácilmente excretables por el organismo.
- Las actividades aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) se midieron espectrofotométricamente (450 nm y 570 nm, respectivamente) en muestras de hígado de acuerdo con los procedimientos estándar usando kits de diagnóstico disponibles comercialmente (Aspartate Aminotransferase (AST) Activity Assay Kit, N°Cat. MAK055 y Alanine Aminotransferase Activity Assay Kit, N°Cat. MAK052, Sigma-Aldrich). Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo amino del aspartato y de la alanina respectivamente al α -cetoglutarato.

3.5.2. Estrés oxidativo

Para el estudio del estrés oxidativo se analizaron: la peroxidación lipídica, las actividades enzimáticas catalasa y glutatión peroxidasa (GPx), el contenido de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) y, por último, la capacidad antioxidante total.

- **Peroxidación lipídica:**

El grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares se estimó en muestras de hígado y riñón con el método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). Este método espectrofotométrico mide el color producido por la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA) a 532 nm. El MDA es un producto secundario formado debido a la peroxidación de los lípidos de membrana. Brevemente, 100 mg de tejido se homogenizan con 0,9 ml de KCl (1,15%), se añaden 2 ml del reactivo TBA (0,375 g de ácido tiobarbitúrico (TBA), 15 g de ácido tricloroacético (TCA), 2,5 ml de ácido clorhídrico (HCl) en 100 ml de agua), se hierve la preparación durante 30 min, posteriormente se enfrían los tubos en hielo durante 5 min y se centrifugan a 4.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante resultante se mide a 532 nm. De este modo, la peroxidación lipídica se expresa como nmol de MDA formados/g de tejido fresco, también denominado TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico).

- **Actividad catalasa:**

La actividad catalasa fue estimada en hígado y riñón mediante la medida de la disminución de la absorbancia del peróxido de oxígeno (H_2O_2) a 240 nm, siguiendo el método descrito por Aebi (1984). Resumidamente, 100mg de tejido se homogenizan en 0,9 ml de PBS y se centrifugan a 10.000 rpm 15 min. A 300 μ l del sobrenadante se le añaden 30 μ l de TritónX-100 al 10% y 2,9 ml de H_2O_2 (14mM en PBS), midiéndose la absorbancia a 240 nm a distintos tiempos.

- **Actividad GPx:**

La actividad GPx se registró a 412 nm usando un kit de diagnóstico de Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, en muestras de hígado y de riñón. El método se fundamenta en que la GPx emplea glutatión como agente donador de poder reductor para reducir el H_2O_2 a agua. La absorbancia a 412nm disminuye según se oxida el glutatión, lo cual es directamente proporcional a la actividad de la GPx en la muestra.

- **Valoración de GSH y GSSG:**

El contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado y riñón, se determinó por el método de Ellman (Ellman, 1959), usando ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB) como reactivo. El glutatión oxidado (GSSG) fue medido en el tejido hepático usando un kit de "Ensayo de Glutathione" suministrado por MBL (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.).

- **Valoración de la capacidad antioxidante total:**

La capacidad antioxidante total fue estimada en muestras de hígado y riñón mediante un kit suministrado por Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, basado en la capacidad de los antioxidantes celulares de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . El Fe^{2+} puede combinarse posteriormente con fenantreno y producir un compuesto final medible a 520 nm.

Una vez estudiados los posibles efectos del L-BMAA sobre el desarrollo normal de los animales y sobre los órganos de detoxificación sistémicos, además de haber seleccionado la dosis más adecuada para mimetizar con más fidelidad los síntomas motores de la ELA, el resto de las determinaciones llevadas a cabo para conocer los efectos de esta toxina *in vivo*, se llevaron a cabo con machos tratados al destete con 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, a partir de los 90 días postratamiento, cuando presentaban una evaluación neurológica no inferior a 7. Aun así, algunas determinaciones se realizaron en momentos más tempranos, detallándose en cada caso.

3.6. Pruebas Funcionales

Teniendo en cuenta que el tratamiento con L-BMAA que elegimos como más adecuado, no provoca síntomas de evolución tan rápida como la encontrada en los modelos genéticos de ELA, nos planteamos implementar una serie de pruebas motoras para determinar cuáles eran los más adecuados para estudiar la condición global de los animales afectados. Así, escogimos la prueba del RotaRod y el test de huellas, que nos permitieron analizar los reflejos de equilibrio y la coordinación motora de los individuos control y tratados.

3.6.1. RotaRod

Se establecieron dos pruebas con el RotaRod que se realizaron a partir del día 30 postratamiento, una vez a la semana, durante los 3 meses siguientes.

- **Tiempo de permanencia:** los animales se situaron en el RotaRod a una velocidad constante de 15 rpm. Se midió el tiempo que los animales eran capaces de permanecer sobre el eje del aparato, hasta un tiempo máximo de 10 min.
- **Velocidad máxima:** situando a los animales sobre el eje del RotaRod, se inició un programa que acelera la rotación de 4 a 40 rpm en 30 s. Se midió la velocidad máxima que soportaban los animales antes de caer del rotor.

3.6.2. Test de huellas

Este test se realizó el día 90 postratamiento, cuando presentan un valor de evaluación neurológica no inferior a 7. Las patas traseras de la rata se empaparon con tinta (figura 7A-B) y se sujetó al animal con cuidado por la espalda con ambas manos, de forma que el cuerpo quedó paralelo a la superficie de aterrizaje (figura 7B). Después, se soltó al animal desde una altura de 30 cm sobre un papel. Se midió la distancia entre la parte trasera de las patas marcadas en las huellas (figura 7D) tal y como lo describen Aoki *et al.* (2011). Tras el ensayo se limpiaron las patas traseras del animal para evitar la ingestión de tinta.

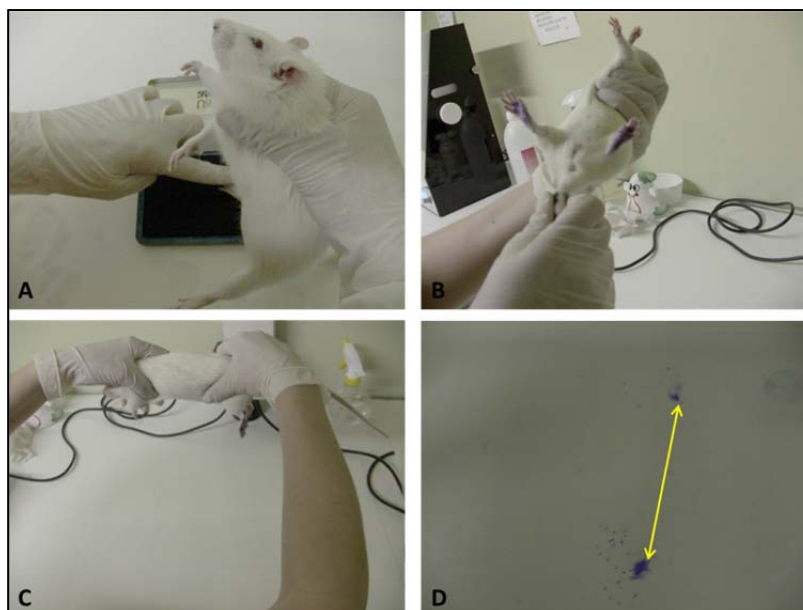


Figura 7: *Test de huellas. A) Impregnación de las patas traseras con tinta, B) Patas marcadas con tinta, C) Posicionamiento del animal a 30 cm de la superficie, D) medida de la distancia entre las patas.*

3.7. Imagen de Resonancia Magnética (IRM)

La imagen de resonancia magnética (IRM) ofrece la posibilidad de obtener datos, *in vivo* y *ex vivo*, sobre los posible daños que haya podido causar la administración de L-BMAA en distintos tejidos, como la pérdida de masa muscular, la reducción del parénquima nervioso o la alteración de los núcleos cerebrales.

Para la realización de estas pruebas se utilizaron 6 animales tratados y 6 controles de la misma edad. Cuando los animales presentaban un valor de evaluación neurológica superior a 7, se realizaron los siguientes ensayos.

3.7.1. IRM *in vivo*:

Mediante esta técnica se realizó la adquisición de las imágenes del cerebro y de las extremidades traseras de los machos control y los tratados. Durante el procedimiento, fueron anestesiados con Isoflurano (Isoba®vet, Schering-Plough, S.A.) al 1,5-2%, fueron mantenidos a una temperatura de 37°C y se usó un sensor de la respiración compatible con resonancia magnética para controlarlos.

Los experimentos de IRM consistieron en imágenes potenciadas en T2 (T2WI) tridimensionales y bidimensionales. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) operando a 4,7 T, equipado con un sistema de gradiente de 11,2 cm, capacitado para una fuerza de gradiente de 200 mT/m y 80 μ s de tiempo de subida. Las imágenes se adquirieron con una sonda de volumen de 7 cm (Bruker).

Para la obtención de las imágenes potenciadas en T2 se utilizó un eco de espín rápido (FSE, de las siglas en inglés), secuencia RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*), con un tiempo de recepción (TR)=1650 s, factor RARE=16, y un intervalo inter-eco=10 ms, que resultaron en un tiempo de eco (TE) efectivo=80 ms, con un número de adquisiciones (NA)=2. Se usó un campo de visión (FOV)= 3,5 \times 3,5 \times 1,75 cm³ en el caso de las imágenes adquiridas del cerebro y FOV=8,0 \times 4,0 cm³ en el caso de las imágenes adquiridas de las extremidades traseras. La matriz de adquisición fue 256 \times 256 \times 64, y estos datos fueron llenados con ceros (como una forma artificial de ganar resolución) para obtener una matriz de reconstrucción de 256 \times 256 \times 256.

El análisis de las imágenes T2W se llevó a cabo con el programa ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, MD), para comparar las diferencias de volumen de las áreas objeto de estudio entre los animales control y los tratados. Las áreas del cerebro analizadas fueron la corteza cerebral total, la corteza motora (áreas M1 y M2) y los ventrículos laterales, que fueron seleccionadas siguiendo el atlas del cerebro de la rata (Praxinos y Watson, 2005). En el caso de las extremidades traseras, se midió el volumen total de músculo esquelético de la extremidad completa. Las regiones de interés se seleccionaron en cada corte, sumándose posteriormente el valor total obtenido en cada una de ellas para obtener el número total de vóxeles. Para calcular el volumen total, el número total de vóxeles se multiplicó por el volumen de cada vóxel (calculado anteriormente multiplicando la resolución obtenida en las tres dimensiones del vóxel). Los volúmenes obtenidos se representaron finalmente como el volumen (mm³)/ volumen total del cerebro (mm³) \times 100 para las regiones medidas en el cerebro, y como volumen muscular (mm³)/peso total del animal (g) para las extremidades traseras, tomando así el peso del animal como referencia de su tamaño total.

3.7.2. IRM ex vivo:

La IRM *ex vivo* permite la adquisición de imágenes a más alta calidad que *in vivo*, lo cual facilita una comparación cualitativa entre distintas áreas del cerebro. Para llevar a cabo estos ensayos es necesaria la correcta preservación del tejido nervioso, por lo que se procedió con la perfusión transcardiaca de los animales.

A los 14 meses de edad se realizó el sacrificio de los animales destinados a esta prueba. Cada animal fue anestesiado con ketamina (100 mg/ml) (Imalgene 1000®, Merial)/xilacina (2%) (Rompun®, Bayer). Seguidamente, se abrió la cavidad torácica, con cuidado de no dañar la vasculatura ni el corazón, y se insertó en el ventrículo izquierdo una cánula (Abbocath®-T, 22G x 32 mm). Se conectó al circuito de perfusión dejando pasar suero salino frío (solución isotónica de cloruro sódico al 0,9%, Braun Medical, SA). Previamente se añadió al 500 ml de suero 400 µl NO₂Na (Panreac) al 1%, para provocar la dilatación de los vasos sanguíneos, y 400 µl de heparina sódica (aproximadamente 400U) (Heparina Hospira® 1%) para evitar la formación de trombos. Se realizó un corte de la aurícula derecha para abrir el circuito de perfusión y se dejó pasar suero salino hasta la total exanguinación del animal. A continuación, se comenzó a pasar la solución fijadora fría de formalina al 10% (4,6 g de NaH₂PO₄·xH₂O (Merk), 16,40 g de Na₂HPO₄·x12H₂O (Merk), 100 ml de formaldehído al 37-40% (Panreac) en 900 ml de agua destilada).

Una vez terminada la fijación, se extrajo el cerebro completo de cada animal, teniendo cuidado de no dañar el tejido durante el procedimiento. El tejido se mantuvo a 4°C en la solución de formalina al 10% hasta la adquisición de las imágenes de resonancia.

El escáner por IRM utilizado *ex vivo* es el mismo que el que se utilizó para la obtención de las imágenes *in vivo* aunque con un sistema de gradientes y sonda diferentes: sistema de gradiente de 6 cm, con un gradiente de fuerza máxima de 450 mT/m, un tiempo de subida de 80 µs y una sonda de volumen de 3 cm (Bruker).

Para llevar a cabo el escáner IRM, los cerebros se introdujeron en Fluorinert FC-40 (3M, Minnesota, EEUU) y, una vez terminada la adquisición, se reintrodujeron en la solución de fijación.

Las imágenes T2W se adquirieron usando una secuencia 3D de eco de espín rápido con los siguientes parámetros: TR = 1,6395 s; TE efectivo = 72 ms; FOV = 2,5 x 2,5 x 2,5 cm³, NA=1. Las dimensiones de la matriz de adquisición y de reconstrucción fueron de 256 x 192 x 64 y 256 x 256 x 64 respectivamente.

Gracias a la alta calidad de las imágenes adquiridas *ex vivo*, se pudieron analizar las posibles diferencias entre animales controles y tratados. El análisis de dichas diferencias se centró en la observación de hiperintensidades en las imágenes potenciadas en T2.

3.8. Espectroscopía por resonancia magnética.

3.8.1. In vivo: Espectroscopía localizada.

El estudio por espectroscopía por resonancia magnética de la corteza motora (figura 8) se llevó a cabo con los animales bajo las mismas condiciones y con la misma sonda que el resto de los experimentos de IRM *in vivo* (apartado 3.7.1). Se seleccionó una secuencia PRESS (*point-resolved spectroscopy sequence*) utilizando un vóxel de 8 x 3 x 5 mm³, con un TR/TE=3000/136ms, un NA=256, un número de puntos=4096 y una anchura espectral=2003,21Hz. Se realizó el ajuste del *shimming* sobre el vóxel. La anchura de línea del agua fue de aproximadamente 20 Hz. Para la supresión de la señal del agua se utilizaron pulsos CHESS (*Chemically SHift Selective Saturation*), saturando un ancho espectral de 60 Hz y utilizando la opción del OVS (*Outer Volume Suppression*) con una anchura de 15 mm. Durante el procesado de los espectros se aumentó el número de puntos de la FID (*free induction decay*) mediante un llenado con ceros hasta 32000 puntos, se realizó la transformada de Fourier, se multiplico por una función exponencial y se corrigió la fase y la línea de base. Los espectros obtenidos se procesaron con el programa informático TOPSPIN, versión 1.3 (Bruker Rheinstetten, Germany).

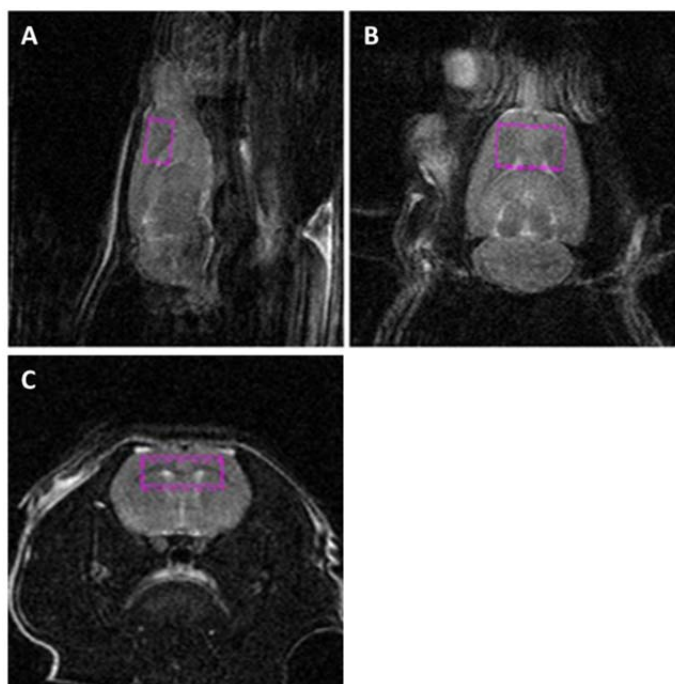


Figura 8: *Imágenes representativas del área seleccionada en el estudio de espectroscopía localizada, en un corte sagital (A), axial (B) y coronal (C).*

3.8.2. Ex vivo: espectroscopia de alta resolución – HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning).

La espectroscopia ^1H RMN *High Resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS), permite el análisis directo de tejidos y fluidos biológicos intactos para obtener espectros de alta resolución, ya que esta técnica requiere solo pequeñas cantidades de muestra.

La espectroscopia HR-MAS se llevó a cabo a 500,13 MHz usando un espectrómetro Bruker AMX500 a 11,7 T. Las muestras se analizaron en un rotor de óxido de circonio de 50 μl y con una velocidad de rotación de 4000 Hz. Una vez realizados los ajustes de homogeneidad, se ajustó el tiempo de adquisición de forma que no se observó la degradación de las muestras durante el análisis. Para minimizar los posibles cambios metabólicos la adquisición se realizó a 4°C. Para poder observar los metabolitos de interés fue necesario realizar un experimento con presaturación de la señal del H_2O . Se usó una secuencia *noesypr1d*, dicha secuencia está basada en el primer incremento de la secuencia del pulso NOESY que permite limitar el efecto de las inhomogeneidades en el espectro. Para la presaturación se aplicó un pulso a la frecuencia de resonancia del agua de 2 s de tiempo de relajación y con un periodo de mezcla $t_m=150$ ms. Se seleccionó una anchura espectral de 8333,33 Hz, un número de puntos de adquisición

de 16 K y 256 acumulaciones. Estos parámetros generaron un tiempo total de adquisición de 14 min. Todos los espectros se procesaron usando el programa informático TOPSPIN, versión 1.3 (Bruker Rheinstetten, Germany). Antes de la transformación de Fourier, la FID se multiplico mediante una función de ponderación exponencial de 0,3 Hz. Una vez corregida la fase y la línea base del espectro, se referenció a cero utilizado como referencia de desplazamiento químico ($\delta=0$ ppm) el singlete del sodio (3-trimetilsilil)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionato.

3.8.2.1. Tejidos:

En nuestro estudio se examinaron la corteza motora y la médula espinal lumbar manteniendo intacto el tejido, usando la técnica de HR-MAS operando a 4°C para minimizar la degradación del tejido e identificar los distintos perfiles metabólicos entre animales control y tratados. Para la realización de estas pruebas se utilizaron 6 animales del grupo de machos tratados al destete con 300 mg/kg/día durante 5 días, y 6 controles. En el día 180 postratamiento (con 6 meses de edad), cuando el valor de evaluación neurológica era superior a 7, los animales se sacrificaron por sobredosis de anestesia con ketamina (100 mg/ml) (Imalgene 1000®, Merial)/xilacina (2%) (Rompun®, Bayer), extrayendo con la máxima rapidez los tejidos de interés. Las áreas objeto de estudio se diseccionaron y se mantuvieron en frío hasta el momento del análisis.

Ya que esta técnica requiere solo pequeñas cantidades de tejido (normalmente 5-20 mg), es posible definir el perfil bioquímico para regiones localizadas en tejidos heterogéneos como el cerebro.

3.8.2.2. Sueros:

Para valorar la presencia de L-BMAA en la circulación de los animales tratados, se extrajo sangre a 6 machos tratados y a 6 controles de la misma edad, 24 horas después de finalizar el tratamiento. Los animales fueron sedados con anestesia inhalada (Isoflurano (Isoba®vet, Schering-Plough, S.A.) al 1,5-2%), se extrajo sangre de la vena yugular con jeringuillas heparinizadas y se almacenó en tubos separadores de suero (Eurotubo®, Deltalab). Los tubos se mantuvieron en hielo para evitar la degradación de

las muestras y se sometió a centrifugación a 4°C y 4000 rpm durante 10 min para separar el suero. Dicho suero se mantuvo congelado a -80°C hasta la realización de la espectroscopía por resonancia magnética.

Gracias a la utilización de esta técnica, sólo se requirió una pequeña cantidad de suero, de 10-50 µl, por lo que se minimizó la cantidad de sangre extraída a los animales.

3.9. Valoración de proteínas por Western-Blot:

Para la valoración de proteínas por western-blot se sacrificaron los animales a partir de los 3 meses postratamiento y con una evaluación neurológica no inferior a 7. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia inhalada (isofluorano (Isoba®vet, Schering-Plough, S.A.) al 4% en un flujo constante de oxígeno), extrayéndose rápidamente el cerebro completo y la médula espinal lumbar, que se conservaron a -80°C hasta la realización de los análisis.

3.9.1. Aislamiento de proteínas:

Se llevaron a cabo tres tipos distintos de aislamiento de proteínas sobre el tejido de la corteza motora y la médula espinal lumbar dependiendo de las proteínas objeto de estudio.

3.9.1.1. GSK3β:

Partiendo de las muestras congeladas, se aislaron secciones de corteza motora y de médula espinal lumbar de 150 mg que se homogeneizaron en 0,5 ml de tampón de lisis (Tris-HCl (Sigma) 50 mM a pH7,5, EGTA (Sigma) 0,5 mM, MgSO₄ (Sigma) 5 mM) al que se añadió justo antes de usarlo un coctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche-Diagnostics, Mannheim, Germany). La lisis se llevó a cabo durante 20 min en hielo. Finalmente, el homogeneizado se centrifugó a 800 x g durante 15 min. Los sobrenadantes obtenidos constituyen los extractos totales de los tejidos (metodología adaptada de Miguel *et al.*, 2001).

3.9.1.2. TDP-43:

Dado que TDP-43 forma parte de la fracción insoluble de las proteínas celulares, es necesario realizar una extracción secuencial de proteínas insolubles (modificada de Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010). Después de extraer fragmentos de 100 mg de corteza motora y de médula espinal lumbar de los tejidos congelados, se homogeneizó cada fragmento en hielo con 0,5 ml de tampón *low salt* (LS) (Tris-HCl 50mM, sacarosa 10%, EDTA (Sigma) 5 mM) añadiendo en el momento de su uso ditioneitol (DTT) 1 mM y un coctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche-Diagnostics, Mannheim, Germany). A continuación se centrifugaron los homogeneizados a 25.000 x g durante 30 min a 4°C y se resuspendieron los pellets 5 ml/g de tejido en tampón Triton X (1% Triton X-100, NaCl 0,5 M en tampón LS) centrifugándose de nuevo a 180.000 x g durante 30 min a 4°C. Seguidamente se resuspendieron de nuevo los pellets con tampón Triton X con un 30 % de sacarosa y se centrifugaron una vez más en las mismas condiciones anteriores para eliminar la mielina de las muestras. Después, se homogenizaron los pellets con 5 ml/g de tejido en tampón Sarcosil (1% N-laurilsarcosina, NaCl 0,5 M, en tampón LS) incubándose a 22°C en agitación durante 1 hora y volviendo acentrifugar. Finalmente, las proteínas insolubles se extrajeron resuspendiendo este último pellet con 0,25 ml/g de tampón de Urea (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato) 4%, Tris-HCl del 50 mM pH 8,5, en H₂O milliQ). Se llevó a cabo una última centrifugación a 25.000xg 30 minutos a 22°C, de la que se conservó el sobrenadante a -80°C como extracto de urea.

3.9.1.3. LC3B y P-mTOR:

Para la valoración de proteínas relacionadas con la activación de vías autofágicas, LC3B y P-mTOR se extrajeron 100 mg de corteza motora y de médula espinal lumbar. Estos tejidos se homogeneizaron en el tampón RIPA (Tris-HCl 50mM a pH 7,4, NaCl 50 mM, nonidet P-40 al 1%, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, Pepstatina 1 µg/ml) en proporción 10 µl/mg de tejido. Cada muestra se sonicó durante 2 minutos, con pulsos de 2 segundos de sonicación y 2 segundos de descanso, a una amplitud del 40%, para obtener homogeneizados óptimos para la valoración de estas proteínas. Protocolo adaptado de Zhang *et al.*, 2011.

3.9.2. Electroforesis y electrotransferencia:

La concentración de proteínas de los sobrenadantes de todas las muestras se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) (reactivo de Bradford, Sigma). Las proteínas de los distintos extractos obtenidos se separaron mediante PAGE-SDS (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™ - ECL).

Para la realización de las electroforesis, las muestras se prepararon previamente poniendo de 25 a 150 µg de proteína por muestra, dependiendo de la proteína, y calentando a 100°C durante 5 minutos con tampón de ruptura (buffer Laemly) con el fin desnaturalizar las proteínas.

En todos los casos se utilizó un gel concentrante con un 6% de poliacrilamida. Sin embargo, los geles separadores tuvieron una concentración de poliacrilamida distinta dependiendo de las proteínas a separar: se utilizaron geles del 10% para GSK3; para la separación de TDP-43 fueron necesarios geles en gradiente del 5 al 15%; dado el alto bajo molecular de LC3B se utilizaron geles del 12% y, dado el alto peso molecular de P-mTOR se utilizaron geles del 8%. Las electroforesis se realizaron con intensidad constante de 40 mA/gel.

Una vez terminada la electroforesis, se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas en sistema húmedo a 10 V durante toda la noche a 4°C.

Los tampones empleados para llevar a cabo el Western-Blot fueron:

- *Running Buffer* 10x a pH 8,3: Tris-Base 0,25 M, glicina 1,92 M, en H₂O milliQ.
- Tampón de Electroforesis: SDS al 0,1% en 100 ml de *Running Buffer* 10x y 1800 ml de H₂O milliQ.
- Tampón de Transferencia: metanol al 20% en 160 ml de *Running Buffer* 10x y 1440 ml de H₂O milliQ.

3.9.3. Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas:

Para marcar las membranas con sus correspondientes anticuerpos, primero se bloquearon durante tres horas a temperatura ambiente con albúmina de suero bobino (BSA, Sigma) al 1% en TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,05%). A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido (según las indicaciones del fabricante) en TBS-Tween con BSA al 1%, toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 5.

Después de lavar con TBS-Tween, las membranas se incubaron 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (*horseradish peroxidase*), disuelto en TBS-Tween con leche en polvo al 4%.

A continuación se lavaron de nuevo las membranas para eliminar el anticuerpo no adherido y se llevó a cabo la detección de proteínas por quimioluminiscencia realizada (ECL, Amersham Biosciences). Las imágenes se adquirieron mediante *Fujifilm Intelligent Darkbox II* (Fuji Systems USA, Stamford, CT) y el tratamiento de las imágenes para su densitometrado se llevó a cabo con el programa de procesado de imágenes de software libre *Image J*.

3.10. Inmunofluorescencia por microscopía confocal

Los análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal se realizaron con muestras, fijadas siguiendo el procedimiento del apartado (apartado 3.7.2), de animales a partir de los 3 meses postratamiento y con una evaluación neurológica no inferior a 7. Una vez realizada la fijación, los cerebros completos se mantuvieron en una solución fijadora de formalina al 10% a 4°C hasta el momento del procesamiento de las muestras.

El primer paso del procesamiento es la criopreservación: manteniendo la orientación adecuada, se cortaron en secciones determinadas el cerebro y la médula de cada animal y se sumergieron en una solución de sacarosa (Merk) al 30% en PBS (Sigma) de 24 a 48 horas. Una vez criopreservados, cada fragmento se introdujo en Tissue-Tek® (Sakura) y se congeló cada bloque a -20°C.

Posteriormente, los bloques se cortaron en un criostato (Leica Biosystems, CM 1850), utilizando una cuchilla desechable (Leica Biosystems, modelo 818), a -22°C en secciones de 10 µm que se recogieron en portas gelatinizados. La gelatinización de los portas se llevó a cabo con anterioridad sumergiendo cada porta en una solución de gelatina (1 g de gelatina para biología molecular (Merk), 0,1 g de sulfato de cromo III y potasio dodecahidrato (Merk) y 200 ml de H₂O) y dejándolos secar. Una vez realizados los cortes, se dejaron 1 h a temperatura ambiente y se guardaron a -20°C hasta la realización de la inmunohistoquímica.

Se llevó a cabo un protocolo de doble marcaje con los cortes de médula espinal lumbar y corteza motora en cámara húmeda. Tras atemperar las muestras 1 h a temperatura ambiente, se hidrataron con PBS y se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 (Sigma) al 0,25% en PBS. A continuación, se bloquearon los cortes con la solución de bloqueo (Triton X-100 al 0,1% y BSA, Sigma) al 10% en PBS) durante 45 min y a continuación se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (disuelto en una solución de Triton X-100 al 0,1% y BSA al 1% en PBS, a la concentración que indica cada fabricante) a 4°C toda la noche. Después de lavarlos portas se procedió al marcaje con el anticuerpo secundario (disuelto de la misma forma que el primario) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. A partir de este punto se trabajó en oscuridad y se repitió el protocolo anterior para realizar el segundo marcaje con el segundo anticuerpo primario y el segundo anticuerpo secundario. En cada uno de los marcajes con los anticuerpos secundarios, se realizó un control negativo para descartar uniones inespecíficas. Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 5.

Una vez finalizados los marcajes, se añadió sobre las preparaciones ProLong®Gold *Antifade Reagent* (Life Technologies™) con DAPI 1 µl/ml (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, disuelto previamente en agua a concentración 2 mg/ml) (AnaSpect). Se mantuvieron las preparaciones en oscuridad a 4°C hasta la adquisición de las imágenes con un microscopio láser, confocal y multifotón (Leica SP-2 AOBS). Las imágenes obtenidas se procesaron posteriormente con el programa informático Leica LAS-AF (*Application Suite Advanced Fluorescence*) Lite (Leica Microsystems CMS GmbH).

3.11. Microscopía electrónica.

Seis machos tratados y sus correspondientes controles, fueron sacrificados tres meses después de finalizar el tratamiento bajo anestesia con ketamina (100 mg/ml) (Imalgene 1000®, Merial)/xilacina (2%) (Rompun®, Bayer). Se siguió el protocolo de perfusión ya detallado en la sección 7.2, pero usando una solución de fijación distinta, que contenía paraformaldehído al 4% (Merck) y glutaraldehído al 1% (solución 25%, TAAB Laboratory and Microscopy) en un tampón fosfato 0,1 M y pH 7,3 (buffer Millonig: $\text{NaPO}_4\text{H}_2\text{x1H}_2\text{O}$ al 2,26% en agua, ajustando el pH con NaOH al 2,52%).

Una vez finalizada la perfusión, se extrajeron fragmentos de médula espinal lumbar y de la corteza motora, separando a partir de este punto las mitad de las muestras de corteza y de médula para la microscopía electrónica convencional, y la otra mitad para inmunohistoquímica por microscopía electrónica.

3.11.1. Microscopía electrónica convencional:

Los animales fueron perfundidos y las muestras extraídas de cada área del sistema nervioso se sumergieron inmediatamente en una solución de fijación con un contenido de paraformaldehído al 4% y de glutaraldehído al 2,5% en buffer Millonig, manteniéndose a 4°C durante 4 h. Después, se llevaron a cabo 3 lavados en buffer Millonig y permanecieron en esta solución en frío hasta el día siguiente.

Seguidamente, se procedió al posfijado del tejido durante una hora en una solución 1:1 de tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Science) al 2% : ferrocianuro potásico acuoso (Panreac) al 3%. A continuación, las muestras se deshidrataron en soluciones seriadas de acetona (desde el 30% hasta el 100% de acetona). Finalmente, se embebieron en resina de Spurr (TAAB Laboratory and Microscopy), utilizando diluciones seriadas acetona:resina (desde el 25% hasta el 100% de resina). Tras la inclusión, los bloques que contenían las muestras se polimerizaron a 72°C en estufa durante 48-72 h. Una vez solidificados los bloques, se realizaron cortes ultrafinos que se marcaron con citrato de plomo de Reynold. Las micrográficas electrónicas se obtuvieron a 80 kV con un microscopio electrónico JEOL 1010 equipado con una cámara Megaview®.

3.11.2. Inmunohistoquímica por microscopía electrónica:

Las muestras destinadas a la inmunohistoquímica se mantuvieron en una solución de fijación con una concentración de paraformaldehído al 4% y de glutaraldehído al 0,1% en buffer Millonig, a 4°C durante 2 h. Después se lavaron con Millonig 3 veces y se dejaron toda la noche en frío con este buffer.

Todo el proceso posterior con las muestras para inmunohistoquímica se realizó a 4°C. Se deshidrataron las muestras con soluciones seriadas de etanol (del 30% al 100%). A continuación, se embebieron las muestras lentamente en Lowicryl K4M (Poly Science) a -30°C. Esta resina se polimerizó a -30°C con luz ultravioleta durante 48 h y a temperatura ambiente durante 24 h. Tanto el proceso de deshidratación como el embebido del tejido y la polimerización se llevaron a cabo con un sistema de sustitución automático de frío (AFS, Leica).

Finalmente, se hicieron cortes ultrafinos (70 nm) de los bloques con un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung, Vienna, Austria) y las secciones fueron solubilizadas secuencialmente en glicina (Sigma) 0,1 M en PBS (Sigma) con BSA (Sigma) al 5%. Las rejillas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos correspondientes (tabla 5, diluidos según las indicaciones del fabricante en PBS con 1% de BSA). Tras lavar con PBS, las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG cabra anti-conejo (80 ng/ml) conjugado con partículas de oro de 15 nm (British Biocell, Cardiff, UK) (dilución 1:200 en PBS). Después de lavar las secciones con PBS y con agua ultrapura, fueron marcadas uranil acetato (Panreac) al 2% durante 20 min y citrato de plomo de Reynold durante 3 min, para examinarlas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010. Los controles negativos se realizaron excluyendo el anticuerpo primario e incubando solo con anticuerpo secundario, no encontrándose marcaje en ningún caso. El programa informático para la edición de imágenes fue Soft Image Viewer (siViewer, Olympus).

3.12. Ensayo de protección con un inhibidor de GSK3 β : VP2.51.

Una vez caracterizado el modelo animal de ELA esporádica por tratamiento con L-BMAA en ratas, se procedió al ensayo de la molécula potencialmente terapéutica VP2.51. El diseño, síntesis y evaluación enzimática del VP2.51 se ha llevado a cabo en el laboratorio de Dra. Ana Martínez en el Instituto de Química Médica del CSIC. Su grupo diseñó, sintetizó y evaluó en GSK3 este compuesto y ya han demostrado con anterioridad el potencial terapéutico de los inhibidores de GSK3 en enfermedades neurodegenerativas (Martínez *et al.*, 2011).

El VP2.51 (figura 9) es un derivado de 1,3-tiazol capaz de inhibir la enzima GSK3. Desde el Instituto de Química Médica del CSIC, se nos han proporcionado los siguientes datos sobre las características bioquímicas y de seguridad farmacológica de este compuesto:

- Es un inhibidor competitivo de GSK3 ($IC_{50} = 0,62 \pm 0,15 \mu M$), que compite con el ATP por el sitio de unión a GSK3. Presenta una alta selectividad por ambas isoformas de GSK3, α y β . Además, a concentraciones más altas también inhibe CK-1 δ (caseína kinasa-1 δ) ($IC_{50} = 7,28 \pm 0,87 \mu M$).
- El compuesto el VP 2.51 muestra una alta probabilidad de paso a través de la BHE, tras analizar su permeabilidad mediante la metodología PAMPA (Paralell Artificial Membrane Permeability Assay). Gracias a este método se calculó que la permeabilidad del VP2.51 es de $7,6 \pm 0,4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$.
- La metabolización hepática de los fármacos y sus metabolitos se realiza principalmente por los citocromos de la familia P450, que son los principales responsables del metabolismo oxidativo de fármacos. Muchas rutas de eliminación de nuestro organismo podrían ser inhibidas, activadas o inducidas por el tratamiento farmacológico. Por ello, los estudios *in vitro* de la inhibición de estos citocromos son muy importantes en el desarrollo temprano de fármacos. En general, un candidato a fármaco se suele rechazar si presenta una inhibición fuerte de estos citocromos. El resultado obtenido para el compuesto VP 2.51 revela que es un inhibidor débil o parcial.

- Otro de los ensayos principales de seguridad farmacológica consiste en la medida de la actividad de los compuestos en los canales iónicos dependientes de voltaje, que están relacionados con la toxicidad cardiovascular. Se midieron las actividades para determinados canales iónicos relacionados con la actividad eléctrica del corazón. Los compuestos se clasifican según su IC_{50} de los canales iónicos. Así se obtuvo que el VP2.51 no presenta una actividad fuerte en los canales iónicos dependientes de voltaje.

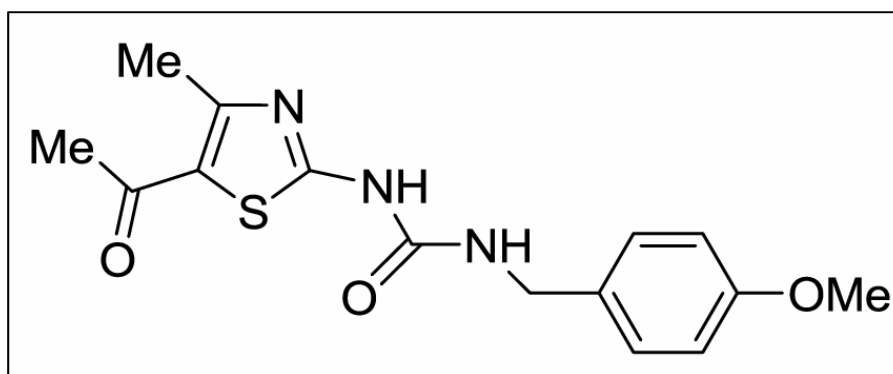


Figura 9: Estructura molecular del inhibidor VP2.51.

Dadas la seguridad farmacológica de este compuesto, su efectividad para atravesar la BHE y su selectividad en la inhibición de GSK3, se procedió a la realización de este ensayo *in vivo*.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron seis grupos de rata macho con los tratamientos que se describen en la tabla 4, con un número mínimo de animales por grupo de 10. El L-BMAA inyectado i.p. se disolvió en PBS y el grupo control fue inyectado con PBS el mismo número de días que duraron las inyecciones de L-BMAA. El VP2.51, dada su baja solubilidad, se disolvió primero en una solución madre de DMSO (dimetil sulfoxido, Sigma) (100 mg/ml), que se llevó a una solución final, para inyectar i.p., de 1 mg/ml en PBS con un 5% de DMSO y un 5% de Tween®80 (Sigma). Se decidieron dos momentos distintos para el inicio del tratamiento con el inhibidor, en el día postratamiento con el L-BMAA 1 (a PT1) y en el día postratamiento 30 (a PT30).

Grupo	Tratamiento
Control	Inyección i.p. de PBS
L-BMAA	L-BMAA: 300 mg/kg/día, durante 5 días consecutivos al destete
VP2.51 a PT1	VP2.51: 2,5 mg/kg/día durante 15 días comenzando el día PT1
L-BMAA+VP2.51 a PT1	1º. L-BMAA: 300 mg/kg/día, durante 5 días consecutivos al destete 2º. VP2.51: 2,5 mg/kg/día durante 15 días comenzando el día PT1
VP2.51 a PT30	VP2.51: 2,5 mg/kg durante 15 días consecutivos comenzando el día PT30
L-BMAA+VP2.51 a PT30	1º. L-BMAA: 300 mg/kg/día, durante 5 días consecutivos al destete 2º. VP2.51: 2,5 mg/kg durante 15 días comenzando el día PT30

Tabla 4: Resumen de tratamientos aplicados en el ensayo con VP2.51.

Con los animales de todos los grupos experimentales se llevó a cabo el control ponderal, la evaluación neurológica y el análisis de marcadores de autofagia de acuerdo con los apartados 3.3, 3.4 y 3.9.1.3. Con estas valoraciones se pretende comprobar la capacidad terapéutica del VP2.51.

3.13. Anticuerpos utilizados en las distintas técnicas.

En la tabla 5 se detallan los anticuerpos usados en las técnicas de western-blot (WB), inmunofluorescencia por microscopía confocal (IF-MC) e inmunohistoquímica por microscopía electrónica (IHQ-ME), y las diluciones empleadas en cada caso.

Denominación del anticuerpo y casa comercial	Técnicas y diluciones empleadas		
	WB	IF-MC	IHQ-ME
Rabbit polyclonal anti-GSK3 β (Ab9) (Signalway Antibody)	1:1000	1:100	1:100
Rabbit polyclonal anti-GSK3 β (Phospho-Ser9) (Signalway Antibody)	1:1000	1:100	1:100
Rabbit polyclonal anti-TDP-43 (ProteinTech)	1:1000	1:200	1:50
Rabbit polyclonal anti-LC3B (Novus Biologicals)	1:1000	1:400	--
Rabbit polyclonal anti-mTOR (Phospho-Ser2448) (Novus Biologicals)	1:1000	1:200	--
Rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling Technology)	--	--	1:200
Rabbit polyclonal anti tubulin β -III (Novus Biologicals)	1:1000	--	--
Rabbit polyclonal anti-NeuN (Bioss)	--	1:100	--
Rabbit polyclonal anti-ubiquitin (Novus Biologicals)	--	1:1000	--
Donkey anti rabbit IgG-Fc Horseradish Peroxidase (HRP) (Bethyl Laboratories)	1:2000	--	--
Goat anti rabbit IgG-Fc fragment conjugated DyLight [®] 594 (rojo) (Bethyl Laboratories)	--	1:100	--
Goat anti rabbit IgG-Fc fragment conjugated DyLight [®] 488 (verde) (Bethyl Laboratories)	--	1:100	--
Goat anti rabbit IgG-Fc conjugated with 15 nm gold particles (British Biocell)	--	--	1:200

Tabla 5: Listado de los anticuerpos utilizados en las distintas técnicas de inmunodetección: western-blot (WB), inmunofluorescencia por microscopía confocal (IF-MC) e inmunohistoquímica por microscopía electrónica (IHQ-ME). Se mantiene la denominación en inglés para facilitar la localización en las casas comerciales.

3.14. Análisis estadísticos.

Los resultados obtenidos en cada uno de los análisis realizados se expresan como media \pm desviación estándar (SD) en las tablas y como media \pm error estándar de la media (SEM) en las gráficas.

Dependiendo del tipo de datos se realizó un análisis estadístico ajustado a cada caso, como:

- Control ponderal: los datos se ajustaron a una regresión sigmoideal de Boltzman y se comparó el punto máximo, el mínimo y la pendiente, entre los grupos de machos y entre los grupos de hembras, con un F-test.
- Análisis de los efectos del L-BMAA sobre el estrés oxidativo en el hígado y el riñón: estos datos se analizaron con una ANOVA de una vía para determinar las diferencias existentes entre controles y tratados, y con una ANOVA de dos vías

para determinar las diferencias existentes entre grupos por el sexo o por el tratamiento.

- Evaluación neurológica y Rota-Rod: en estos casos se normalizaron los datos, se ajustaron a una regresión lineal y se comparó mediante un F-test las diferencias en la pendiente y la elevación de las rectas.
- El resto de los datos se analizaron con un t-test cuando sólo se comparaban los grupos de animales control y tratados (test de huellas, volumen de las extremidades traseras y de áreas cerebrales, perfil metabólico cerebral, densitometrados de western-blot y nivel de neurotransmisores a largo plazo postratamiento) y mediante una ANOVA de una vía cuando se comparaban más de dos grupos (nivel de neurotransmisores a corto plazo postratamiento).

Todos los análisis y el procesamiento de los datos se llevó a cabo con el programa informático GraphPad Prism v 5.03. Las diferencias se consideraron significativas a partir de un p-valor $\leq 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Control ponderal

Para asegurar que la administración de L-BMAA no alteraba el desarrollo físico normal de los animales, desde el inicio de cada tratamiento hasta el momento del sacrificio de los distintos grupos, se realizó un control del peso tanto de las ratas control como de las ratas tratadas.

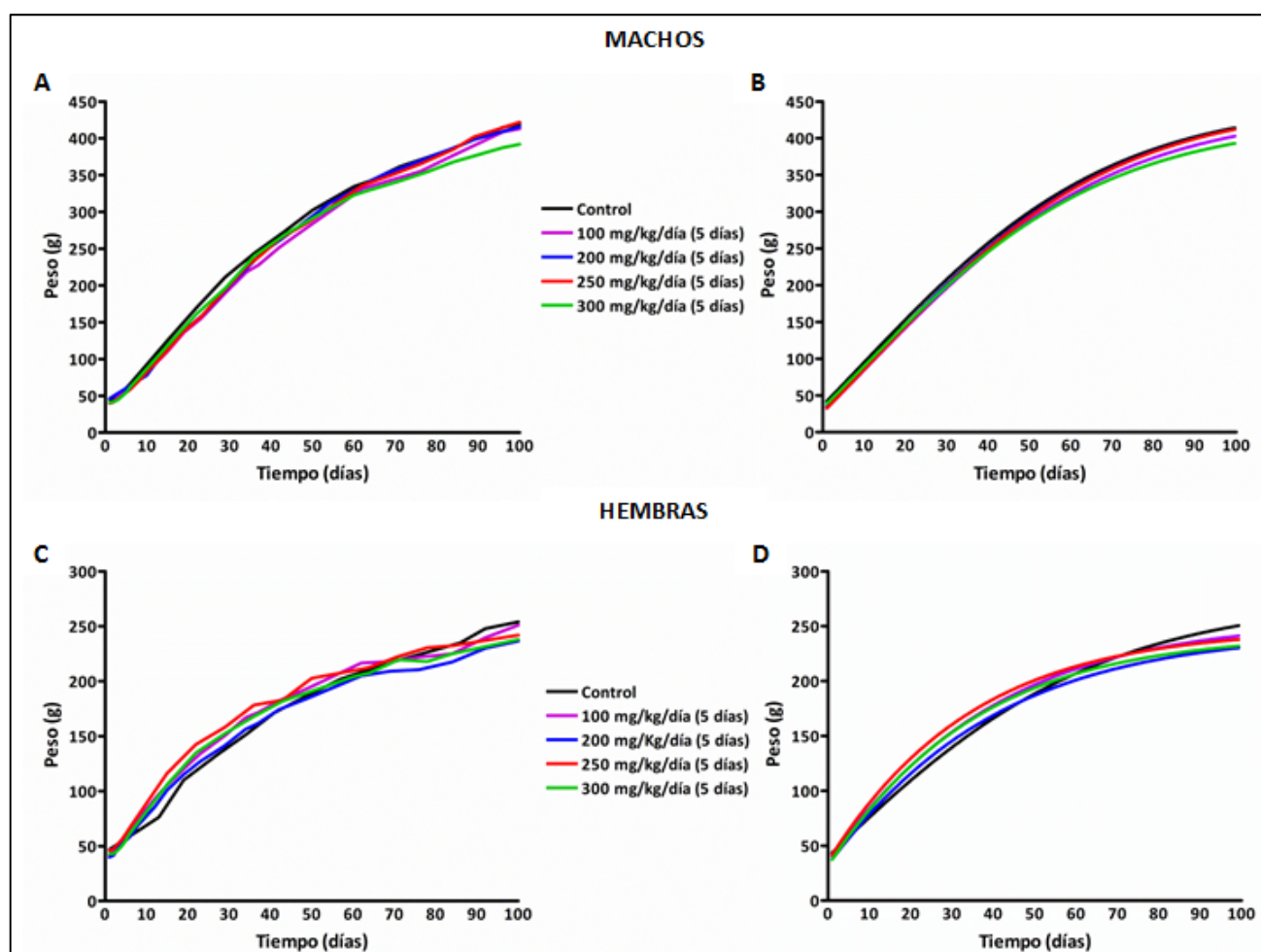


Figura 10: Control ponderal. A y C) Evolución del peso de los machos y las hembras de los grupos con dosis entre 100-300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos tratados al destete (día posnatal 21), con un grupo control representativo de cada sexo. B y D) Ajuste sigmoidal de Boltzman que permite analizar las diferencias entre grupos.

El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre los pesos de los animales tratados con L-BMAA, tanto machos como hembras, y sus respectivos controles con ninguna de las dosis administradas. La figura 10 muestra la evolución del

peso de los animales pertenecientes a los grupos tratados al destete (día posnatal 21) con dosis entre 100-300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, con un grupo control representativo. No se muestran las dosis de 600 mg/kg/día durante 5 días consecutivos dado que el tratamiento con esta dosis se tuvo que interrumpir dada la alta mortalidad de los animales tratados.

4.2. Dosis de L-BMAA y evaluación neurológica

Se realizó un barrido de dosis de L-BMAA entre los 50 a los 600 mg/kg/día (desglosados en la tabla 2) que dio lugar a la elección de la dosis que mimetizaba con más fidelidad la evolución lenta y continua de los síntomas motores que se querían alcanzar. Para poder evaluar con más precisión la evolución de los síntomas motores que presentaban los animales tratados con L-BMAA, se desarrolló en nuestro laboratorio una escala de evaluación neurológica del 0 al 10 (tabla 3) (de Munck *et al.*, 2013). Dicha escala de evaluación se realizó por comparación entre los animales control, que presentan un control motor normal correspondiente a un nivel de evaluación 0, y los distintos grupos de animales tratados, que presentaron distintas alteraciones del control motor, hasta un nivel máximo de 10 que corresponde con la pérdida total de la funcionalidad de las extremidades traseras y del control postural.

La evolución neurológica de los animales (machos y hembras por separado) tratados con dosis de L-BMAA comprendidas entre los 100 y los 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos se muestra en la figura 11. Los datos correspondientes a la evaluación de los animales control no se muestran en la gráfica porque se superponen con el eje de abscisas.

La dosis más baja, de 50 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, no produjo efectos neurológicos observables por los experimentadores, por lo que sus resultados no se muestran en la figura 11. Así mismo, la dosis más alta, de 600 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, causó una toxicidad demasiado alta, provocando incapacidad para moverse y alimentarse sin asistencia en el 90% de los animales tratados con el tóxico tras la segunda dosis, por lo que se decidió suspender el tratamiento. En estos animales se observó debilidad muscular, falta de coordinación y de movilidad de las patas traseras y temblor generalizado en todo el cuerpo.

Los tratamientos a distintas dosis con L-BMAA demostraron que este tóxico induce un daño neurológico dependiente de la dosis. La dosis de 100 mg/kg/día produce un daño neurológico leve que aparece tardíamente en comparación con el resto de los grupos de tratamiento. Los análisis por regresión lineal no muestran diferencias significativas en los machos entre los tratamientos de 200 a 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, por lo tanto en este intervalo de dosis se consigue un nivel de daño neurológico similar para los machos. Sin embargo, en el caso de las hembras el tratamiento de 300 mg/kg/día presenta una evaluación significativamente más alta con el grupo de 250 mg/kg/día ($F=4,3$, $p=0,04$) y con el grupo de 200 mg/kg/día ($F=14,26$, $p=0,00032$).

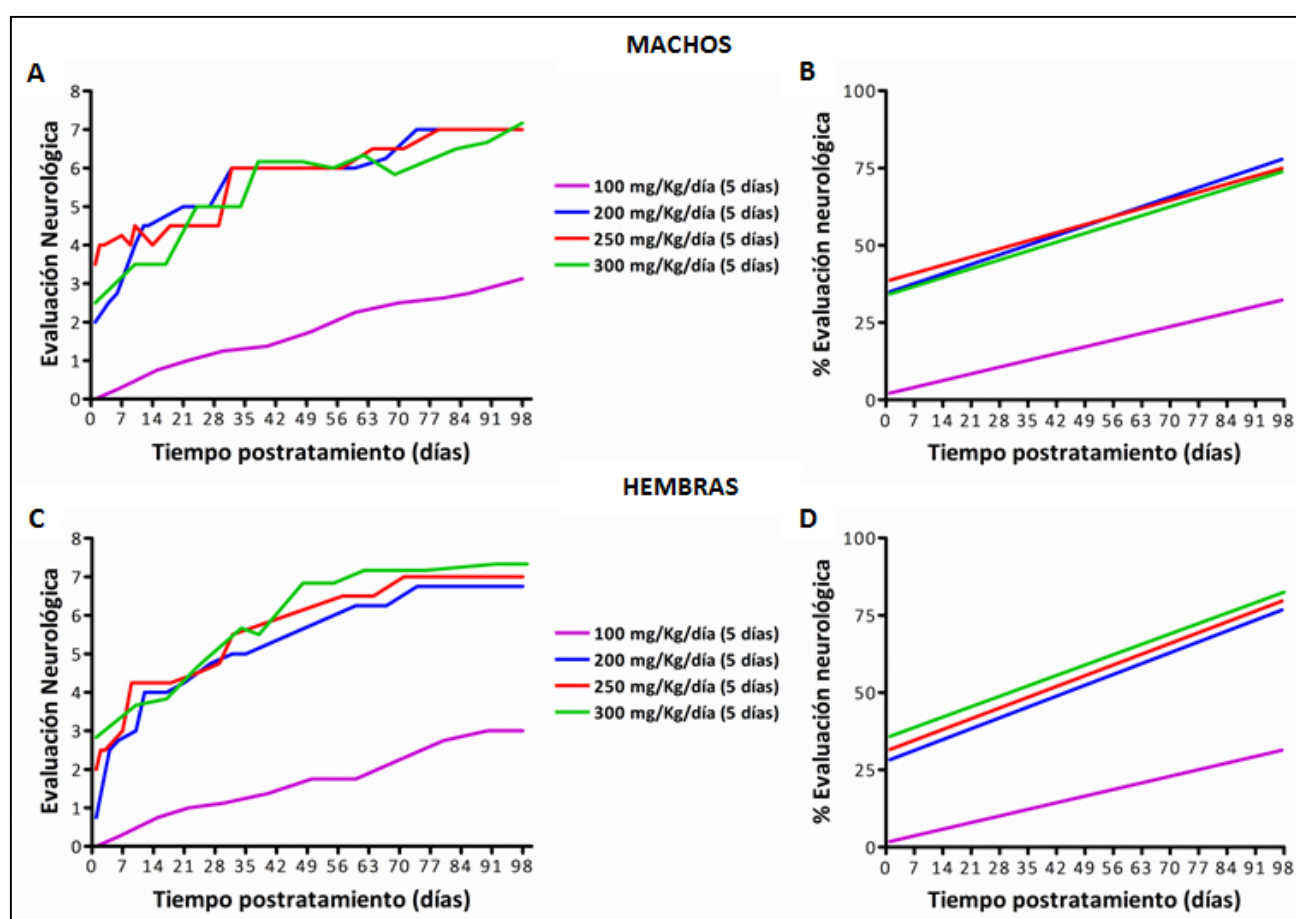


Figura 11: Evaluación neurológica. A y C) Evolución de la evaluación neurológica de los grupos entre 100 a 300 mg/kg/día 5 días consecutivos y regresión lineal. B y D) Regresión lineal para analizar las diferencias entre los grupos. Quedan excluidas las dosis de 50 y 600 mg/kg/día. El grupo control no se muestra dado que su gráfica de evaluación coincide con el eje de abscisas.

Para determinar el momento más sensible al tratamiento con este aminoácido neurotóxico, se ensayaron dos dosis de 200 mg/kg/día, una con machos al destete y otra con machos adultos de un mes de edad. Los resultados que se muestran en la figura 12, demuestran que el grupo tratado al destete alcanza una evaluación neurológica significativamente más elevada ($F=10,32$, $p=0,0025$), por lo que se decidió iniciar el tratamiento al destete.

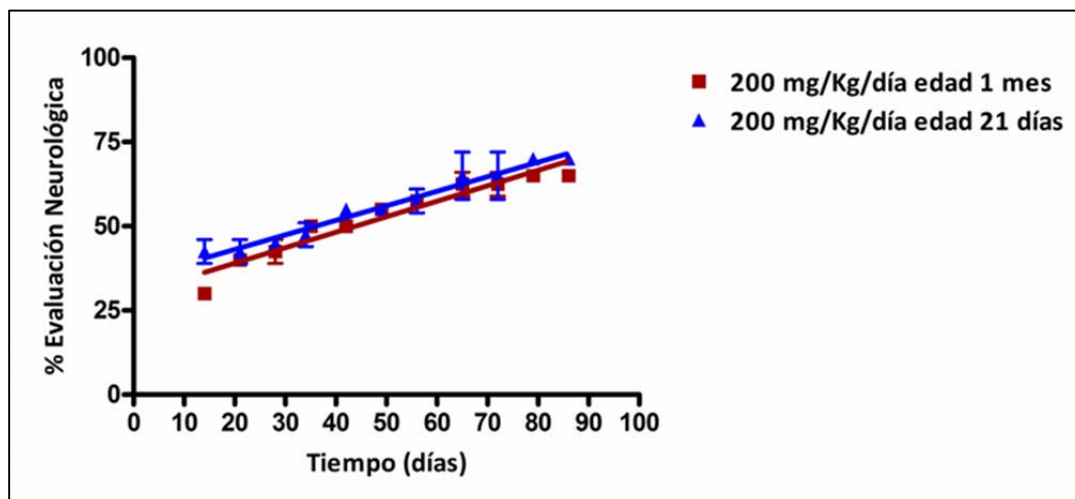


Figura 12: Regresión lineal de la evaluación neurológica obtenida con los dos grupos tratados con 200 mg/kg/día 5 días consecutivos con un mes de edad y al destete.

El periodo de administración del fármaco se decidió mediante la comparación de dos grupos tratados con 200 mg/kg/día al destete, uno durante 5 días consecutivos y otro durante 10 días. Los resultados expuestos en la figura 13, muestran que el tratamiento más prolongado no presenta diferencias significativas con el tratamiento de 5 días, por lo que nos decantamos por el tratamiento más corto.

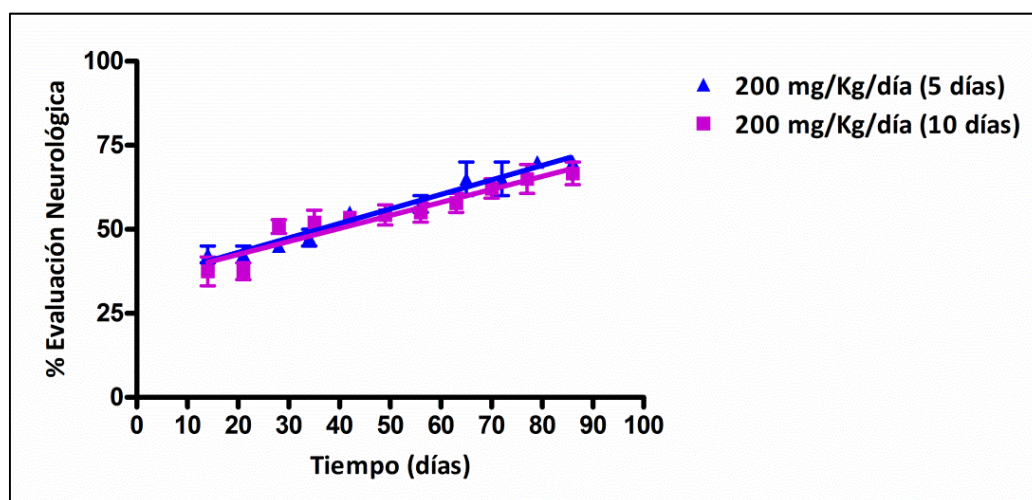


Figura 13: Regresión lineal de la evaluación neurológica obtenida con los dos grupos tratados con 200 mg/kg/día al destete, durante 5 días consecutivos y durante 10 días consecutivos, respectivamente.

Finalmente, se decidió tratar a los animales destinados a la realización de las pruebas posteriores, con una dosis de 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos iniciando el tratamiento al destete, para asegurar la afectación en niveles elevados de la mayor parte de los individuos. Dado que las hembras presentaron un comportamiento más errático en la realización de las pruebas neurológicas, posiblemente por la influencia en el comportamiento de las hormonas del ciclo estral que no se habían controlado, se eligió observar la evolución a largo plazo (14 meses), solamente de los machos de este grupo (figura 14).

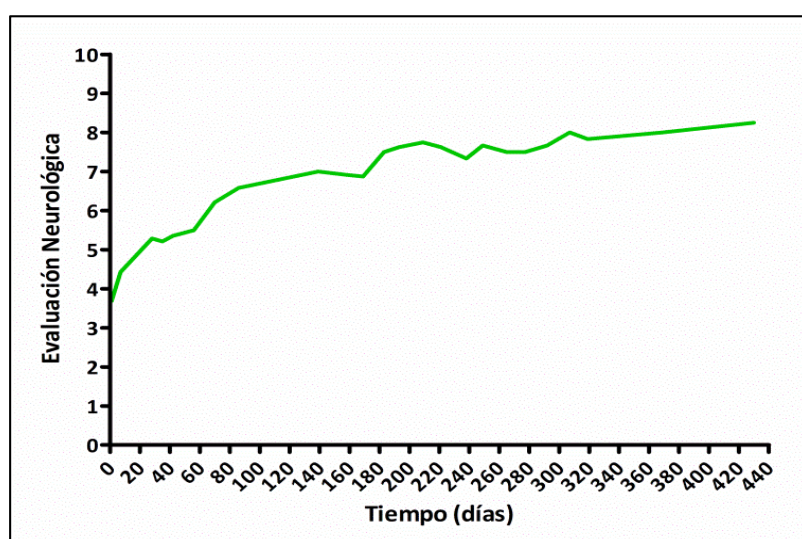


Figura 14: Evolución de la evaluación neurológica durante 14 meses en el grupo de machos tratados 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos iniciando el tratamiento al destete (DPN 21).

En la figura 14 podemos observar que la evaluación neurológica de los machos tratados con la dosis seleccionada, aumenta progresivamente durante el periodo de estudio. Aunque durante los primeros 4 meses la evolución es más rápida, después hay una fase de estabilización en la que la evaluación aumenta más lentamente.

4.3. Detección de L-BMAA en suero

Una vez seleccionado el tratamiento con L-BMAA más idóneo para provocar *in vivo* los efectos neurológicos buscados, se estudió la presencia de este aminoácido en suero tras finalizar el periodo de administración. 24 horas después de finalizar las inyecciones, se extrajo sangre de 6 machos tratados y a 6 controles, analizándose el suero obtenido por HR-MAS.

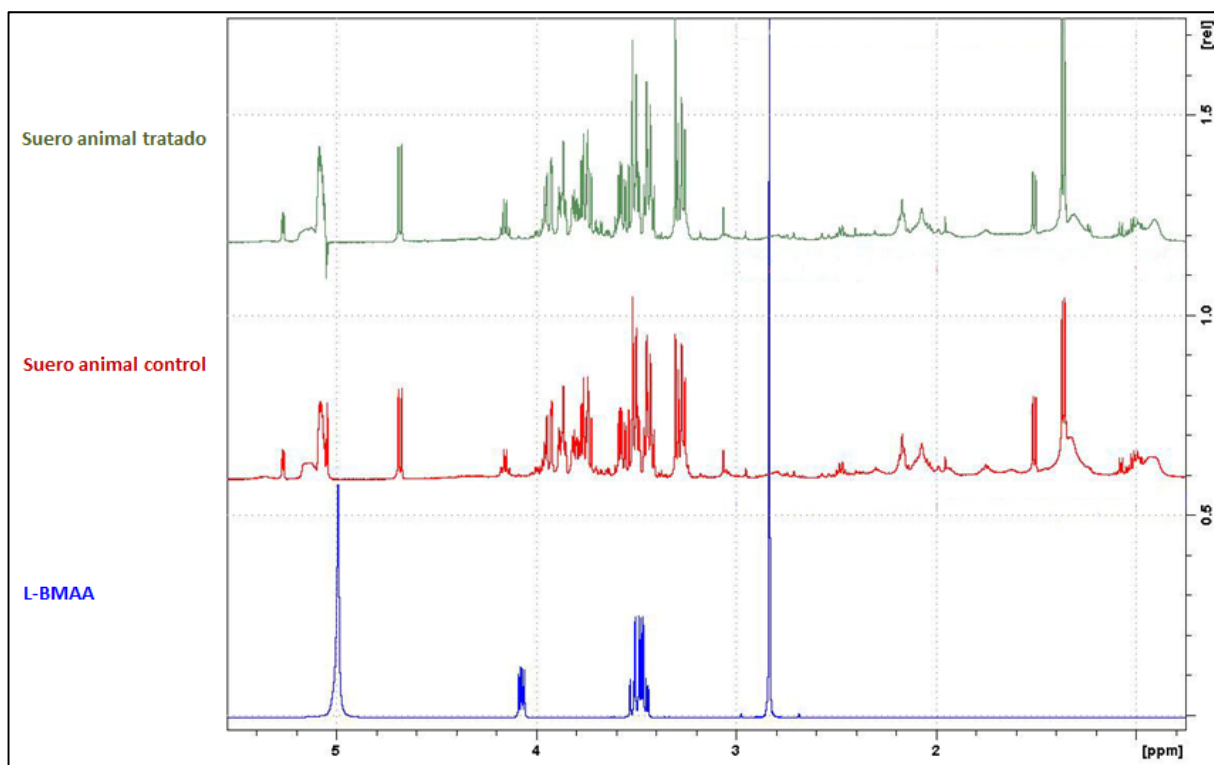


Figura 15: Espectros obtenidos por HR-MAS. Se muestran los espectros (de arriba a abajo) de un macho tratado con L-BMAA y un macho control representativos del conjunto de sueros analizados, y el espectro del L-BMAA.

Tras obtener el espectro del L-BMAA, se comparó con los espectros obtenidos de los animales control y los tratados (figura 20). Ninguno de los picos obtenidos en los espectros de los sueros coincide con los del espectro del L-BMAA. Por lo tanto, el L-BMAA no está presente, de forma libre (no unido a proteínas) y en cantidades detectables mediante esta técnica de alta sensibilidad, en el suero de los animales tratados 24 h tras finalizar el tratamiento. Es decir, el L-BMAA sufre un aclaramiento rápido del torrente circulatorio, posiblemente por eliminación por los sistemas de detoxificación y por su incorporación a las proteínas dentro los tejidos.

4.4. Análisis del estado de los sistemas de detoxificación sistémicos

Con el fin de evaluar los efectos adversos que pudiera causar el L-BMAA sobre los animales tratados, se analizaron varios parámetros relacionados con la funcionalidad del hígado y con el posible daño oxidativo que pudiera producir este aminoácido sobre los principales sistemas de detoxificación del organismo, es decir, los sistemas hepático y renal. Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron los hígados y los riñones de los animales tratados con L-BMAA al destete con 250 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, dado que ésta dosis es de las más altas administradas.

4.4.1. Análisis del perfil hepático

El estudio comienza con un análisis del perfil hepático para conocer los efectos del L-BMAA, como agente xenobiótico, sobre la funcionalidad de este órgano. La tabla 6 muestra que el contenido proteico en el hígado está incrementado en los animales tratados, tanto en machos ($F=7,95$, $p<0,05$) como en hembras ($F=18,68$, $p<0,01$). Sin embargo, sólo en el caso de las hembras tratadas, disminuye muy significativamente el contenido en albúmina ($F=14,79$, $p<0,01$) y aumentan significativamente los niveles de colesterol ($F=5,57$, $p<0,05$).

Finalmente, de las enzimas hepáticas evaluadas, sólo se observó modificación de la fosfatasa ácida (ACP), que aparece incrementada significativamente en mayor proporción en las hembras ($F=70,2$, $p<0,01$) que en los machos tratados ($F=9,13$, $p<0,05$). Resulta interesante señalar que no se observaron cambios en las actividades transaminasas.

	Hembras		Machos	
	Control	L-BMAA	Control	L-BMAA
Proteínas (mg/g)	218 ± 7	279 ± 34**	198 ± 14	222 ± 14*
Albumina (mg/g)	132 ± 19	94 ± 16 **	121 ± 14	105 ± 26
Colesterol (mg/g)	1.88 ± 0,27	2.51 ± 0,65 *	1,64 ± 0,34	1,64 ± 0,35
Triglicéridos (mg/g)	9,13 ± 3	12,57 ± 2,62	11,55 ± 2,62	14,24 ± 2,05
AST (U/g)	1,41 ± 0,11	1,47 ± 0,19	1,31 ± 0,08	1,29 ± 0,1
ALT (U/g)	1,32 ± 0,11	1,28 ± 0,15	1,22 ± 0,02	1,2 ± 0,06
ACP (U/g)	1,58 ± 0,17	2,43 ± 0,21**	1,82 ± 0,49	2,52 ± 0,36*
ALP (U/g)	0,67 ± 0,24	0,9 ± 0,32	1,77 ± 0,62	2,04 ± 0,31

Tabla 6: Efecto de la administración de L-BMAA sobre algunos parámetros bioquímicos hepáticos. Todos los valores están expresados como media ± SD (n=7). *, ** indican diferencias de p-valor < 0,05 < 0,01 respectivamente con el grupo control.

4.4.2. Estrés oxidativo en hígado y riñón

Respecto a las medidas relacionadas con el estrés oxidativo, no se obtuvieron diferencias significativas en el estrés oxidativo total entre los sexos ni en hígado ni en riñón.

Los resultados muestran que el L-BMAA causa en el hígado de rata, tanto de machos como de hembras, un incremento significativo en el grado de peroxidación lipídica (F=12,76, p<0,01 y F=6,2, p<0,05, respectivamente) (figura 16A), así como en la actividad de la enzima catalasa (F=21,02, p<0,01 y F=7,4, p<0,05, respectivamente) (figura 17A). La actividad GPx sólo se vio incrementada en el caso de los machos tratados (F=18,25, p<0,01) (figura 18A).

Los niveles de GSH también incrementaron muy significativamente en el hígado en ambos sexos (machos: F=44,8, p<0,01; hembras: F=15,4, p<0,01) (figura 19A). Dado el enorme incremento de GSH en este órgano, también se midieron los niveles de GSSG. Como era de esperar dado el gran incremento de la actividad GPx en los animales tratados, se encontró un incremento en los niveles de GSSG en machos y hembras

tratados en comparación con sus respectivos controles (machos: $F=41,35$, $p<0,001$; hembras: $F=10,27$, $p<0,001$) (figura 19A).

Por otra parte, es importante señalar el incremento significativo de la capacidad antioxidante total en el hígado de machos ($F=127,69$, $p<0,01$) y hembras ($F=72,18$, $p<0,01$) (figura 20A).

Los resultados obtenidos para el tejido renal de los animales tratados con L-BMAA, muestran un incremento significativo de los niveles de peroxidación lipídica sólo en los machos ($F=5,69$, $p<0,05$) (figura 16B). La actividad catalasa se ve incrementada en ambos sexos (machos: $F=37,54$, $p<0,01$; hembras: $F=6,75$, $p<0,05$) (figura 17B).

Mientras que los niveles de GSH se ve incrementados sólo en los machos ($F=10,42$, $p<0,05$) (figura 19B), la actividad glutatión peroxidasa disminuyó significativamente en el tejido renal de ambos sexos (machos: $F=10,1$, $p<0,05$; hembras: $F=6,66$, $p<0,05$) (figura 18B), al contrario de lo que sucedía en el hígado. Finalmente, la capacidad antioxidante total subió también en el caso del riñón, tanto en machos como en hembras tratados ($F=7,26$, $p<0,05$; $F=25,65$, $p<0,01$, respectivamente) (figura 20B).

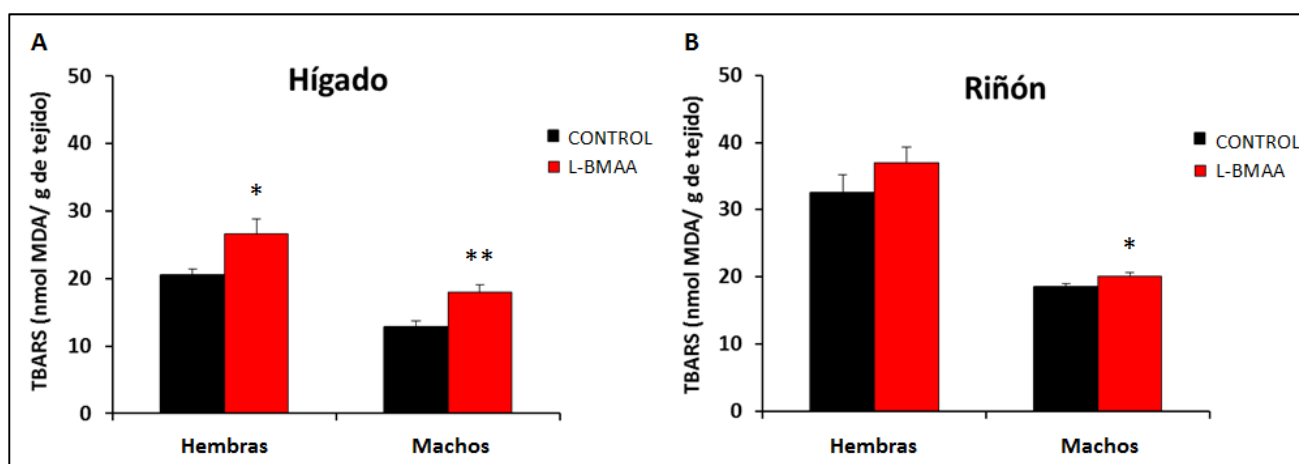


Figura 16: Efecto de la administración de L-BMAA sobre la peroxidación lipídica medida a través de los niveles de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) de los tejidos hepático (A) y renal (B). Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=7$). *, ** indican diferencias de p -valor $<0,05$ $<0,01$ respectivamente con el grupo control.

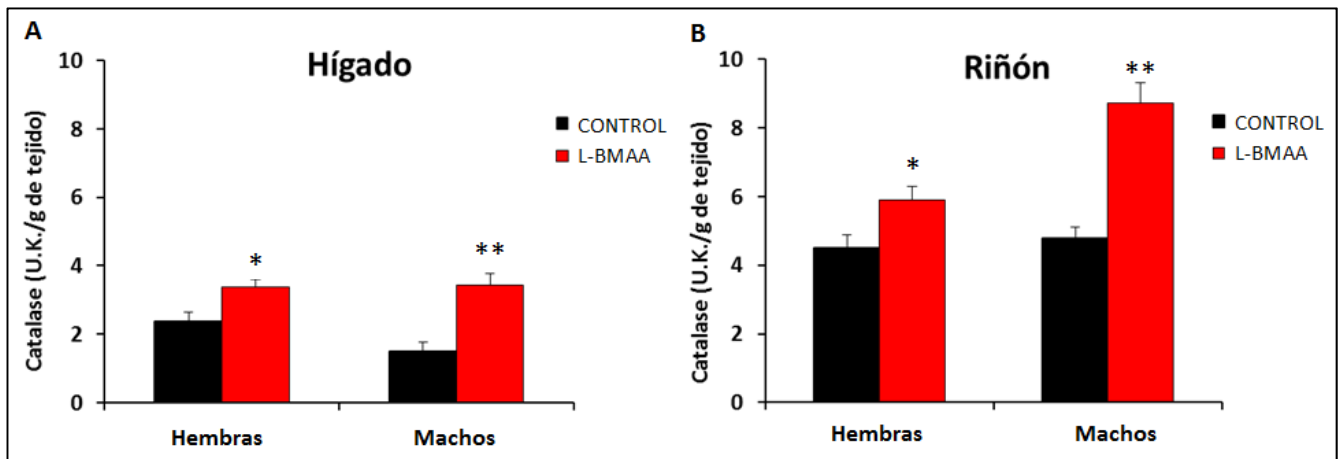


Figura 17: Efecto de la administración de L-BMAA sobre la actividad catalasa de los tejidos hepático (A) y renal (B). Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=7$). *, ** indican diferencias de p -valor $<0,05$ $<0,01$ respectivamente con el grupo control.

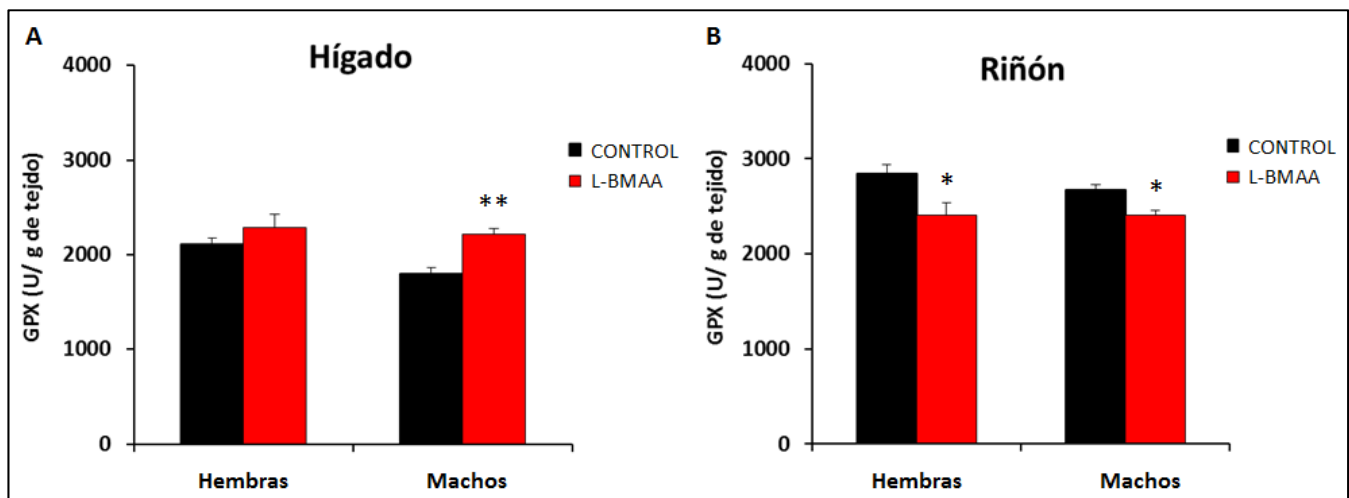


Figura 18: Efecto de la administración de L-BMAA sobre la actividad GPx en los tejidos hepático (A) y renal (B). Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=7$). *, ** indican diferencias de p -valor $<0,05$ $<0,01$ respectivamente con el grupo control.

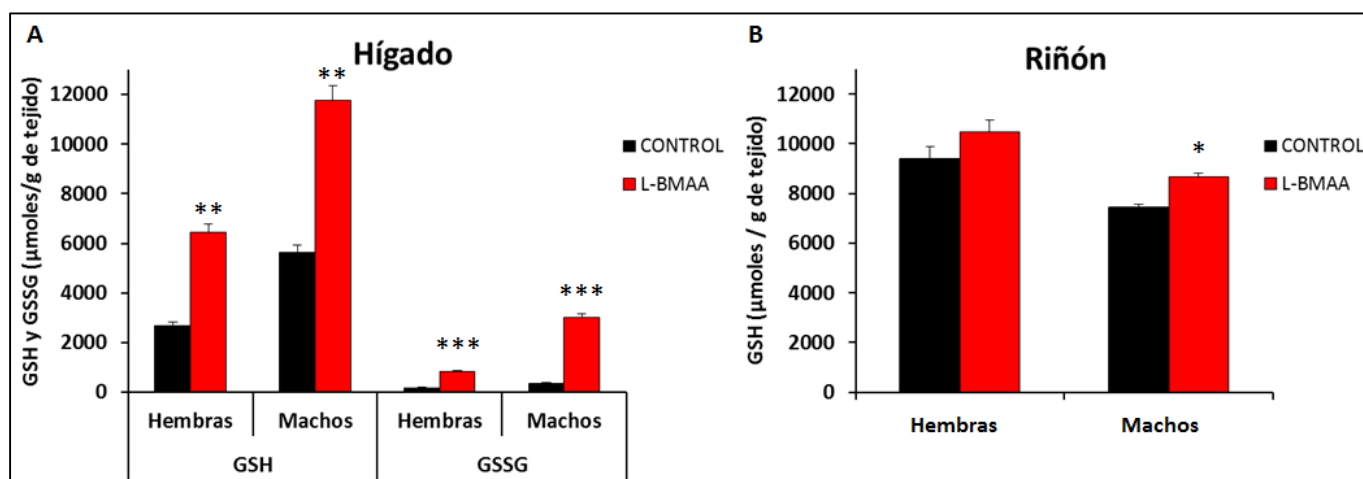


Figura 19: Efecto de la administración de L-BMAA sobre las concentraciones de GSH y GSSG en el tejido hepático (A) y la concentración de GSH (B) en el tejido renal. Todos los valores se expresan como media \pm SEM ($n = 7$). *, **, *** indican diferencias de p -valor $<0,05$, $<0,01$, $<0,001$ respectivamente con el grupo control.

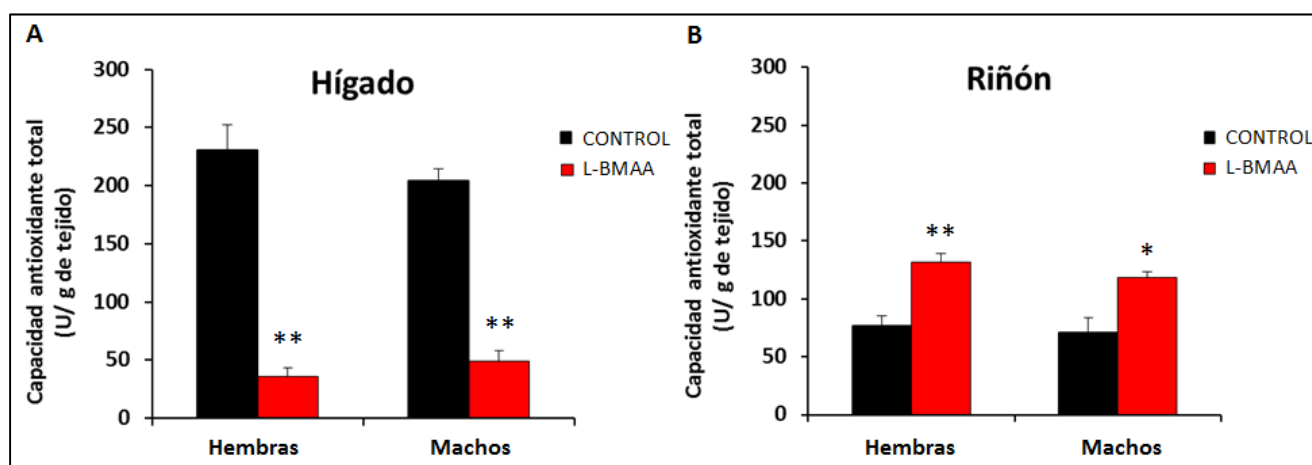


Figura 20: Efecto de la administración de L-BMAA sobre la capacidad antioxidante total de los tejidos hepático (A) y renal (B). Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=7$). *, ** indican diferencias de p -valor $<0,05$ $<0,01$ respectivamente con el grupo control.

Una vez comprobado que el L-BMAA no tiene efectos sobre el desarrollo normal de los animales y que produce una serie de efectos motores, el resto de las determinaciones llevadas a cabo para conocer los efectos de esta toxina *in vivo* se llevaron a cabo con machos tratados al destete con 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, a partir de los 90 días postratamiento, cuando presentaban una evaluación neurológica no inferior a 7. Sin embargo, algunos ensayos se tuvieron que realizar en momentos más tempranos, detallándose en cada caso.

4.5. Pruebas Funcionales:

4.5.1. RotaRod

4.5.1.1. Velocidad constante:

Los resultados obtenidos para el RotaRod midiendo el tiempo máximo que aguantan los animales a una velocidad constante de 15 rpm (figura 21), muestran que tanto las hembras como los machos tratados aguantan menos tiempo sobre el aparato que sus respectivos controles (hembras: $F=17,17$, $p<0,001$; machos: $F=8,27$, $p<0,001$), lo cual implica que el L-BMAA ha causado alteraciones neuromusculares en estos animales. Sin embargo se aprecia que la evolución a lo largo del tiempo es distinta: mientras que las hembras van aumentando el tiempo sobre el eje de rotación, los machos mantienen la misma media a lo largo de todo el periodo de estudio. Estos resultados indican que el daño neurológico que afecta a la coordinación motora necesaria para la realización de esta prueba se ha producido previamente al inicio de estas pruebas, y que en el caso de las hembras se produce una ligera mejoría en este aspecto concreto de la coordinación motora. Si bien, la evolución de los machos control indica que estos animales reducen progresivamente el tiempo de permanencia, posiblemente porque el aumento de peso, que en el caso de los machos es mucho mayor que en el de las hembras, impide la realización correcta de la prueba a partir de edades superiores a la testadas.

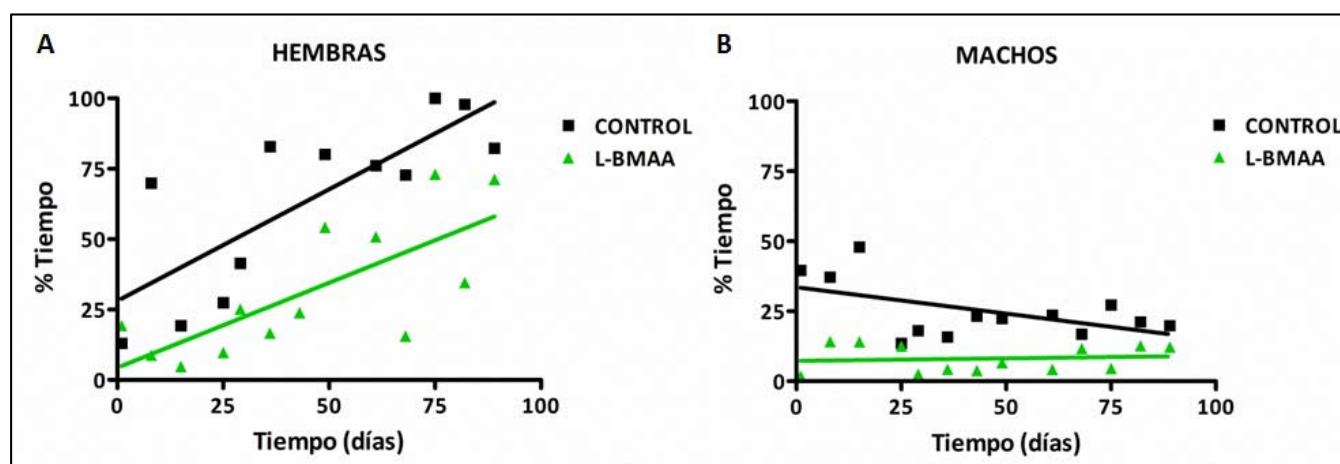


Figura 21: RotaRod a una velocidad constante de 15 rpm. A) Regresión lineal de hembras controles y tratadas, y B) regresión lineal de machos controles y tratados del grupo de 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos.

4.5.1.2. Aceleración:

Los resultados obtenidos en la prueba del RotaRod en el modo aceleración no mostraron diferencias significativas entre los tratados y los controles (no se muestran los datos).

4.5.2. Test de huellas

El test de huellas (figura 22) muestra que los animales tratados no separan las extremidades traseras en el aterrizaje de forma distinta que los controles. Aunque no existen diferencias significativas, si se puede observar la tendencia a abrir menos las patas traseras por parte de los animales tratados, tanto hembras como machos. Hemos observado que estos animales presentan una mayor rigidez en las extremidades traseras que los controles, lo cual puede afectar a la capacidad de amortiguar la caída.

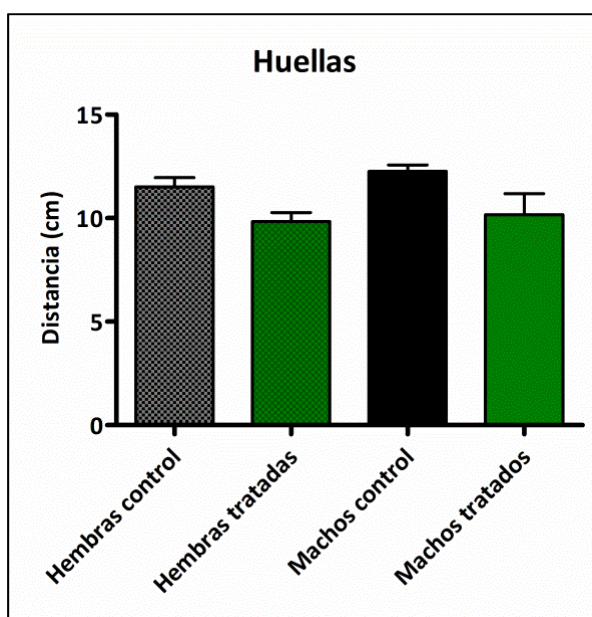


Figura 22: Test de huellas: representa la distancia en cm entre las patas traseras en el aterrizaje, de las hembras y los machos del grupo tratado con 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos. Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=10$).

4.6. Análisis por Imagen de Resonancia Magnética (IRM)

4.6.1. Volumen muscular de las extremidades traseras

El análisis del volumen muscular de las extremidades traseras por IRM, reveló que existe una pérdida de volumen muscular progresiva en los animales tratados con L-BMAA en comparación con los controles. A los 6 meses de edad, los animales tratados muestran una disminución del volumen muscular significativa en la extremidad trasera izquierda ($t=3,186$, $p=0,033$) (figura 23B), con una pérdida del 17,5 % de volumen. Sin embargo, en la extremidad derecha (figura 23A) no existen diferencias significativas, aunque si se aprecia una disminución del volumen de un 15%.

A los 8 meses de edad, estos mismos animales presentan una mayor pérdida de volumen muscular en ambas extremidades traseras. En la extremidad izquierda hay una disminución del volumen significativa ($t=3,186$, $p=0,021$) (figura 24B) de un 23,89 %, mientras que en la extremidad derecha hay una disminución del volumen significativa ($t=3,281$; $p=0,031$) (figura 24A) de un 19,81%.

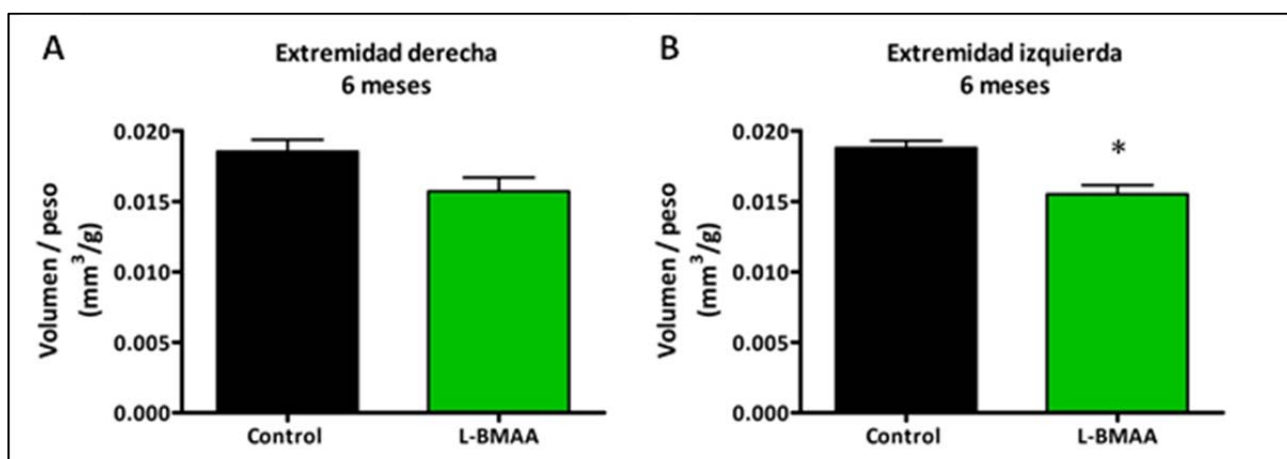


Figura 23: Medida a los 6 meses de edad del volumen de las extremidades traseras A) derecha y B) izquierda, tomando como referencia del tamaño de los animales el peso de los mismos. Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=6$). * indica diferencias de p -valor $<0,05$ con el grupo control.

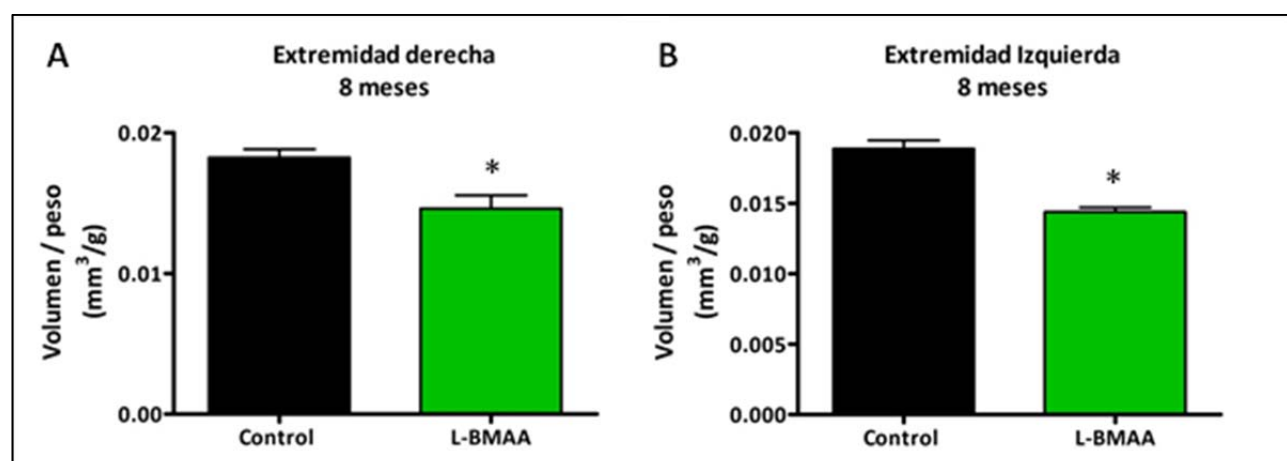


Figura 24: Medida a los 8 meses de edad del volumen de las extremidades traseras A) derecha y B) izquierda, tomando como referencia del tamaño de los animales el peso de los mismos. Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=6$). * indica diferencias de p -valor $<0,05$ con el grupo control.

4.6.2. Volumen de la corteza cerebral

El análisis de los cambios en el volumen de la corteza cerebral o de áreas determinadas de la misma por IRM, pueden ser indicadores de una pérdida neuronal causada por la acción del L-BMAA. A los 8 meses de edad (7 meses postratamiento) los animales tratados no muestran diferencias significativas en el volumen de la corteza cerebral total de ambos hemisferios (figura 25 A y B) en comparación con sus respectivos controles.

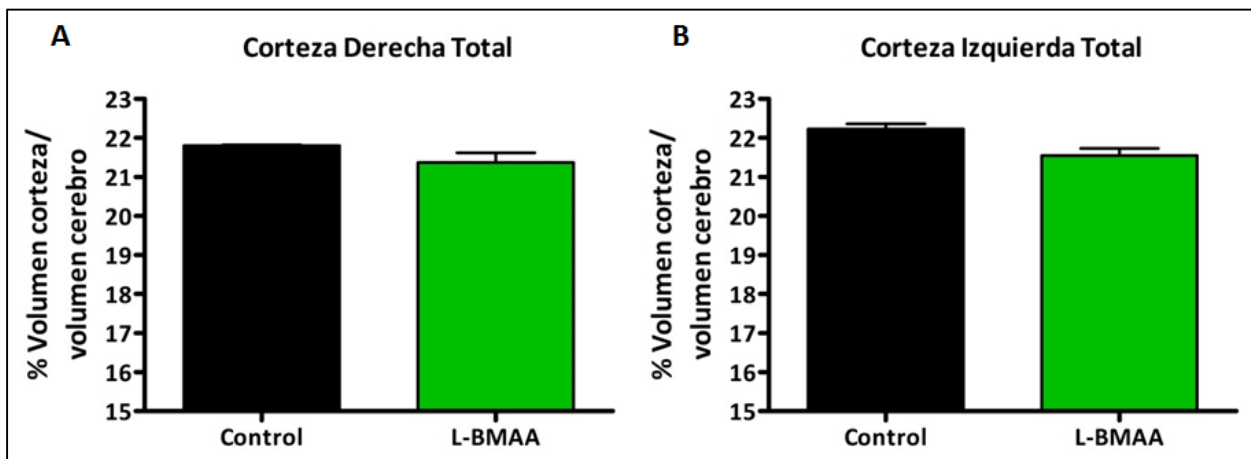


Figura 25: Medida a los 8 meses de edad del porcentaje del volumen de la corteza cerebral A) derecha y B) izquierda con respecto al tamaño total del cerebro. Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=6$).

Sin embargo, si se observan diferencias significativas respecto al volumen de la corteza motora (áreas M1 y M2). Se observa una disminución del volumen muy significativa en la corteza motora derecha ($t=5,28$, $p=0,0061$) (figura 26A) de un 10,28%, así como en la corteza motora izquierda ($t=4,965$, $p=0,0077$) (figura 26B) con una disminución del 18,77%, en los animales tratados con L-BMAA en comparación con los controles. Dicha pérdida de volumen indica una reducción del parénquima nervioso en esta área concreta, muy implicada en el control del movimiento.

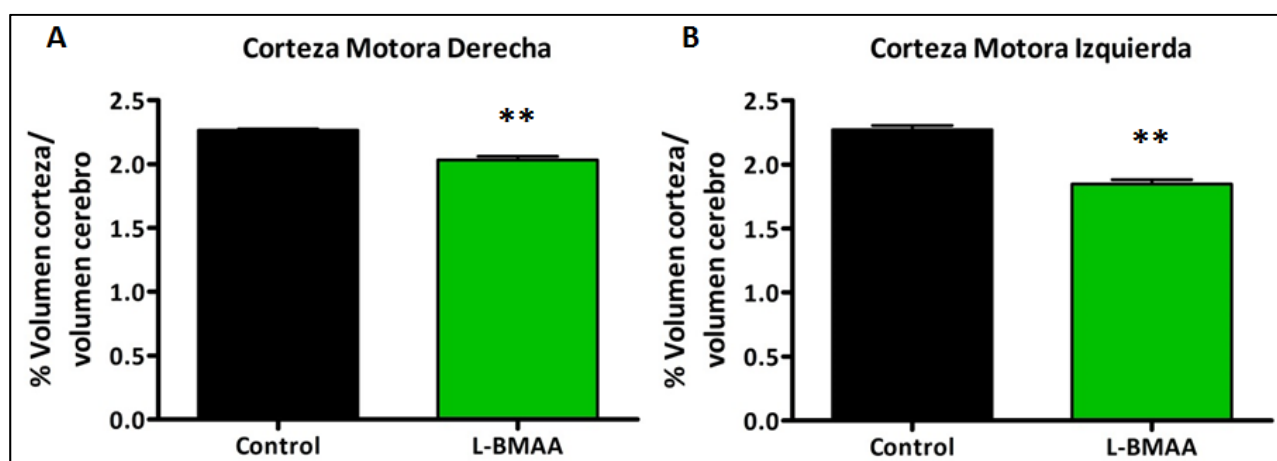


Figura 26: Medida a los 8 meses de edad del porcentaje del volumen de la corteza cerebral A) derecha y B) izquierda con respecto al tamaño total del cerebro. Todos los valores están expresados como media \pm SEM ($n=6$). ** indica diferencias de p -valor $<0,01$ con el grupo control.

4.6.3. Volumen de los ventrículos laterales

Las imágenes de resonancia magnética tomadas 8 meses postratamiento mostraban un aumento de volumen de los ventrículos laterales para los animales tratados (figura 27). Sin embargo, el procesamiento posterior de las imágenes no mostró diferencias significativas en ninguno de los dos ventrículos laterales, derecho o izquierdo, aunque si se aprecia una tendencia a aumentar el volumen de los mismos (figura 28 A y B respectivamente). Hay que destacar que el aumento del volumen del ventrículo lateral derecho es de 59,39% y el del izquierdo es de un 27,65% con respecto a los controles. La ausencia de significación en el análisis estadístico se debe a que estos datos presentan mayor variabilidad que en el caso del volumen de la corteza.

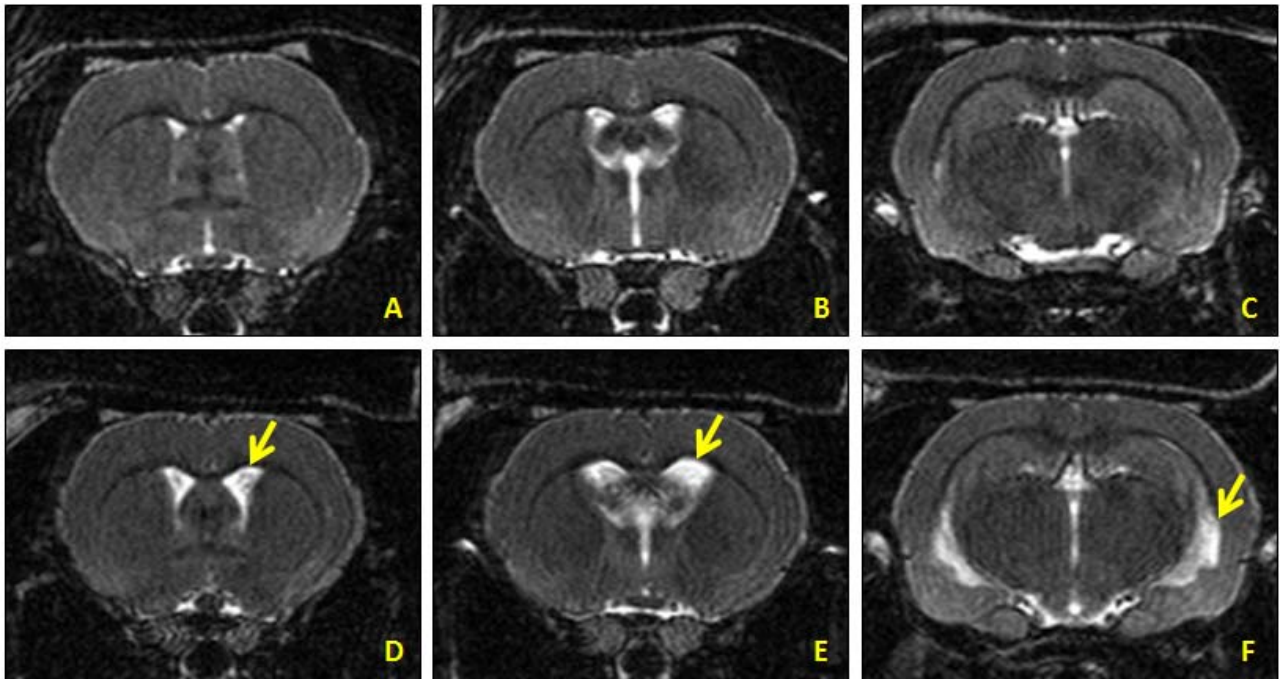


Figura 27: IRM del cerebro de un animal control representativo (imágenes A, B y C) y de un animal tratado representativo (imágenes D, E y F) del grupo tratado con 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, 8 meses después de finalizar el tratamiento. Se aprecian las grandes diferencias en el volumen de los ventrículos laterales (señalados con flechas) entre controles y tratados.

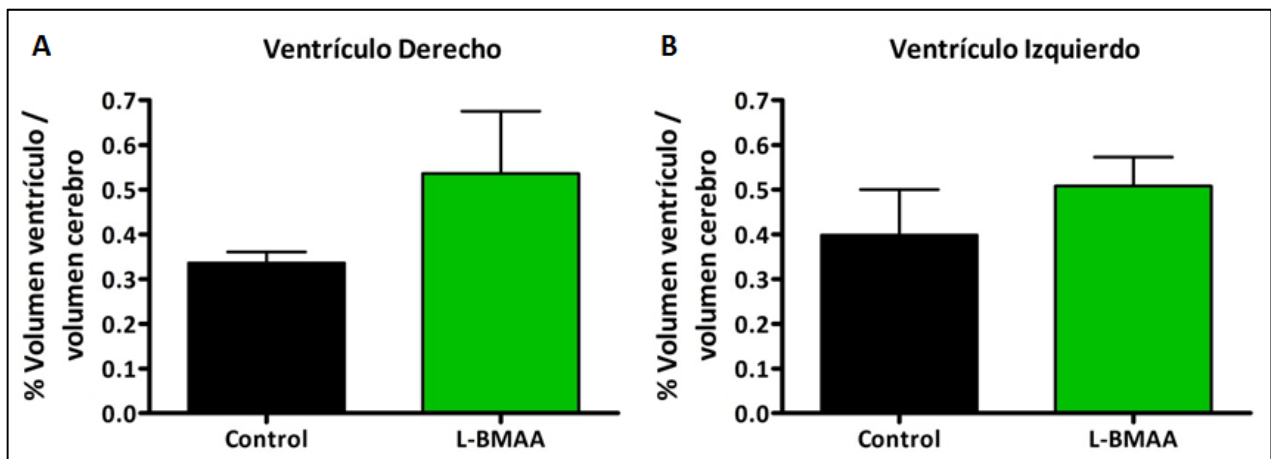


Figura 28: Medida a los 8 meses de edad del porcentaje del volumen de los ventrículos laterales A) derecho y B) izquierdo con respecto al tamaño total del cerebro. Todos los valores están expresados como media \pm SEM (n=6).

4.6.4. Alteración de los núcleos bulbares

En nuestro modelo experimental de ELA esporádica en rata hemos querido comprobar si se producen alteraciones en los núcleos bulbares. A través del análisis de las imágenes obtenidas por resonancia magnética *ex vivo* (con una gran calidad de imagen), se analizaron las diferencias de intensidad a lo largo de todo el tronco encefálico entre ratas control y tratadas. Nuestros resultados muestran un patente incremento en la intensidad del núcleo motor del trigémino y del núcleo del tracto solitario, ambos implicados en el reflejo del vómito, en los animales tratados con L-BMAA respecto a los animales control.

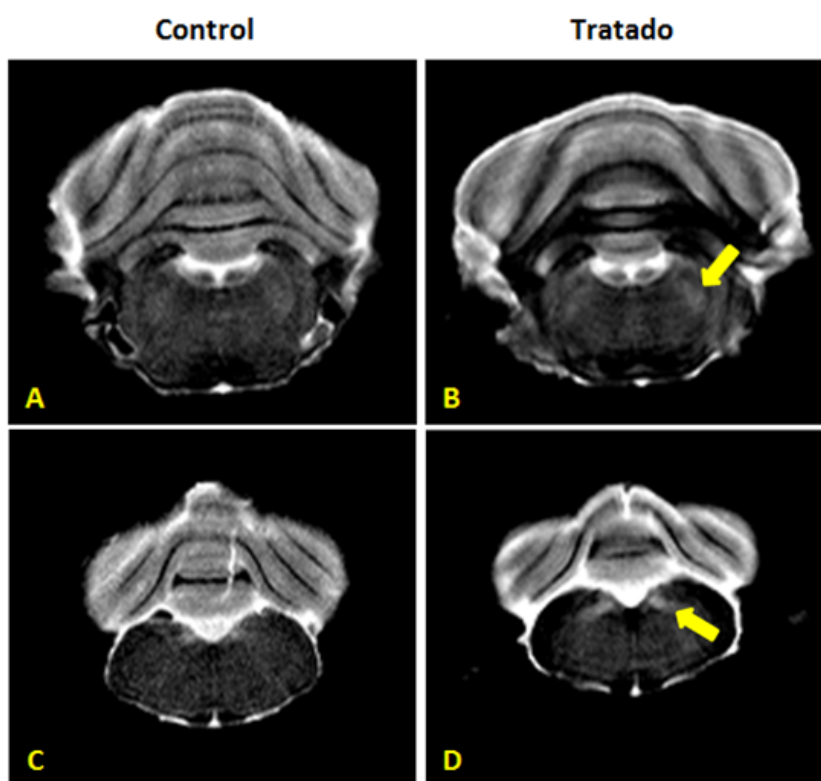


Figura 29: Imágenes por resonancia magnética *ex vivo* a nivel bulbar representativas de las alteraciones observadas entre el grupo control y el grupo tratado. A-B) Imágenes a nivel del núcleo motor del trigémino de un animal control y un animal tratado, respectivamente. C-D) Imágenes a nivel del núcleo del tracto solitario de un animal control y un animal tratado, respectivamente. Las hiperintensidades halladas en los animales tratados están señaladas por flechas.

Lo primero que llama la atención es la hiperintensidad hallada en el núcleo motor del trigémino en los animales tratados con L-BMAA (figura 29B) en comparación con los animales control (figura 29A). En la figura 29 C y D, podemos observar el patente aumento de la intensidad del núcleo del tracto solitario en los animales tratados con L-BMAA. Estos resultados señalan una alteración de los núcleos bulbares implicados en la deglución por el tratamiento con L-BMAA, y ofrecen una conexión entre la disfagia que presentan los pacientes de ELA y los efectos de este neurotóxico.

4.7. Perfil metabólico del tejido nervioso

Aunque se pueden distinguir más de 30 metabolitos en el tejido nervioso mediante HR-MAS, el N-acetilaspártato (NAA), la creatina (Cr) y la colina (Cho) han sido medios principalmente debido a sus patrones espectrales simples (singlete) y a sus concentraciones relativamente altas en el cerebro. Mediante el análisis por espectroscopia de resonancia magnética se encontró que los animales tratados con L-BMAA presentan alteraciones en el metabolito N-acetilaspártato (NAA) indicado mediante los ratios de NAA/Cr (N-acetilaspártato/creatina), NAA/Cho (N-acetilaspártato/colina) y NAA/Cr+Cho (figura 30).

Los resultados obtenidos muestran una disminución del NAA tanto en la corteza motora como en medula espinal lumbar de los animales tratados con L-BMAA. El cociente NAA/Cr disminuye de forma muy significativa en la médula ($t=13$, $p=0,0059$) (figura 30A), con más de un 17% de bajada, mientras que en la corteza disminuye sólo ligeramente. El ratio NAA/Cho es significativamente menor en ambos tejidos, de forma altamente significativa en la corteza motora ($t=329,1$, $p<0,0001$) con una disminución de más del 30%, y de forma más moderada pero significativa en la médula ($t=9,113$, $p=0,012$), con una caída de aproximadamente un 13,5% (figura 30B). Finalmente, el ratio NAA/Cr+Cho disminuye de forma muy similar en ambos tejidos (alrededor de un 15%), siendo esta diferencia significativa tanto en médula ($t=21,38$, $p=0,002$) como en corteza ($t=15,49$, $p=0,004$).

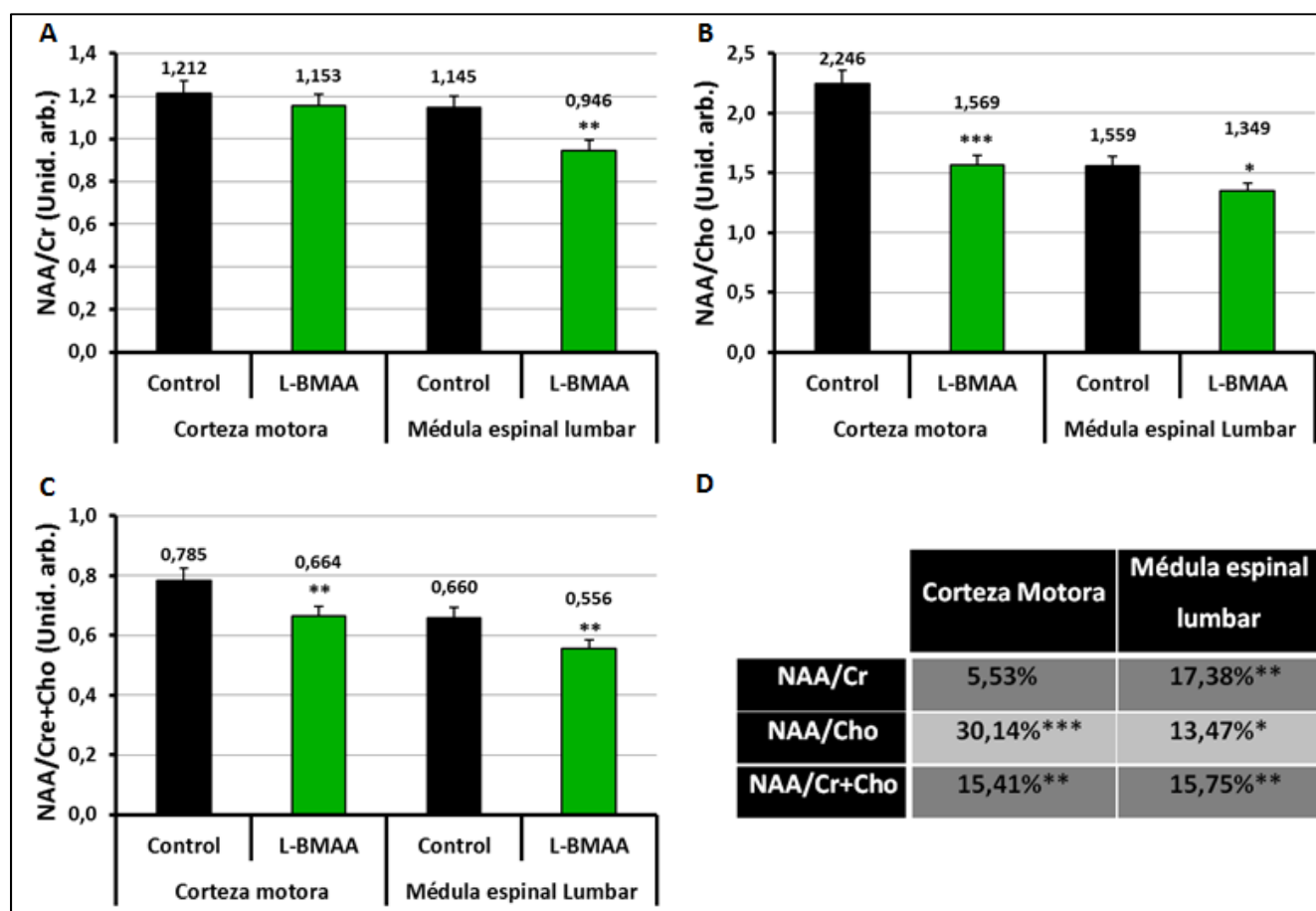


Figura 30: Alteración de metabolitos en la corteza motora y la médula espinal lumbar.

A) Variación del cociente NAA/Cr. B) Variación del cociente NAA/Cho. C) Variación del cociente NAA/Cr+Cho. D) Porcentaje de disminución de metabolitos en animales tratados con L-BMAA respecto a los animales control, obtenidos mediante HR-MAS. Los datos se expresan como media \pm SEM. *, **, *** indican diferencias de p-valor $<0,05$ $<0,01$ $<0,001$ respectivamente, con el grupo control.

4.8. Alteraciones ultraestructurales

El estudio por microscopía electrónica del tejido nervioso de la médula espinal lumbar y la corteza motora han revelado importantes alteraciones ultraestructurales. Tanto en las neuronas de la corteza motora (figura 31) como en las motoneuronas de la médula espinal (figura 32) se pueden apreciar diferencias evidentes entre los animales control y los tratados, como son:

- Gran parte del retículo endoplásmico aparece desorganizado en los animales tratados con L-BMAA (figuras 31F, 32C), se observan las cisternas cortas y desensambladas, aunque algunas zonas permanecen organizadas. Además, en el citoplasma de estas células puede apreciarse un intenso punteado, más patente que en el caso de los animales control, que se debe a la disociación de los ribosomas del retículo endoplásmico en una proporción mayor a la habitual.
- Además, se observa una gran cantidad de mitocondrias en proceso de vacuolización, con las crestas mitocondriales hinchadas (figuras 31E, 32 C y F).
- Aparecen varios signos que indican la activación de procesos degenerativos, fundamentalmente la presencia de numerosos autofagosomas. Se han detectado fagosomas desde el proceso de formación (figuras 31E, 32E), que aparecen como las membranas de las cisternas del aparato de Golgi empezando a envolver diferentes orgánulos como los ribosomas, hasta los estadios finales en forma de fagolisosomas (figuras 31 C y F, 32D) que aparecen como grandes vesículas de color oscuro.
- Por otra parte, se ha encontrado una gran proporción de neuronas con grandes invaginaciones de la membrana nuclear, sobre todo en la corteza motora (figuras 31D, 32D). A estas alteraciones neuronales de los animales tratados con L-BMAA, hay que añadir una posible alteración de la oligodendroglía, en la que se ha observado la presencia de núcleos típicamente apoptóticos (figura 33).

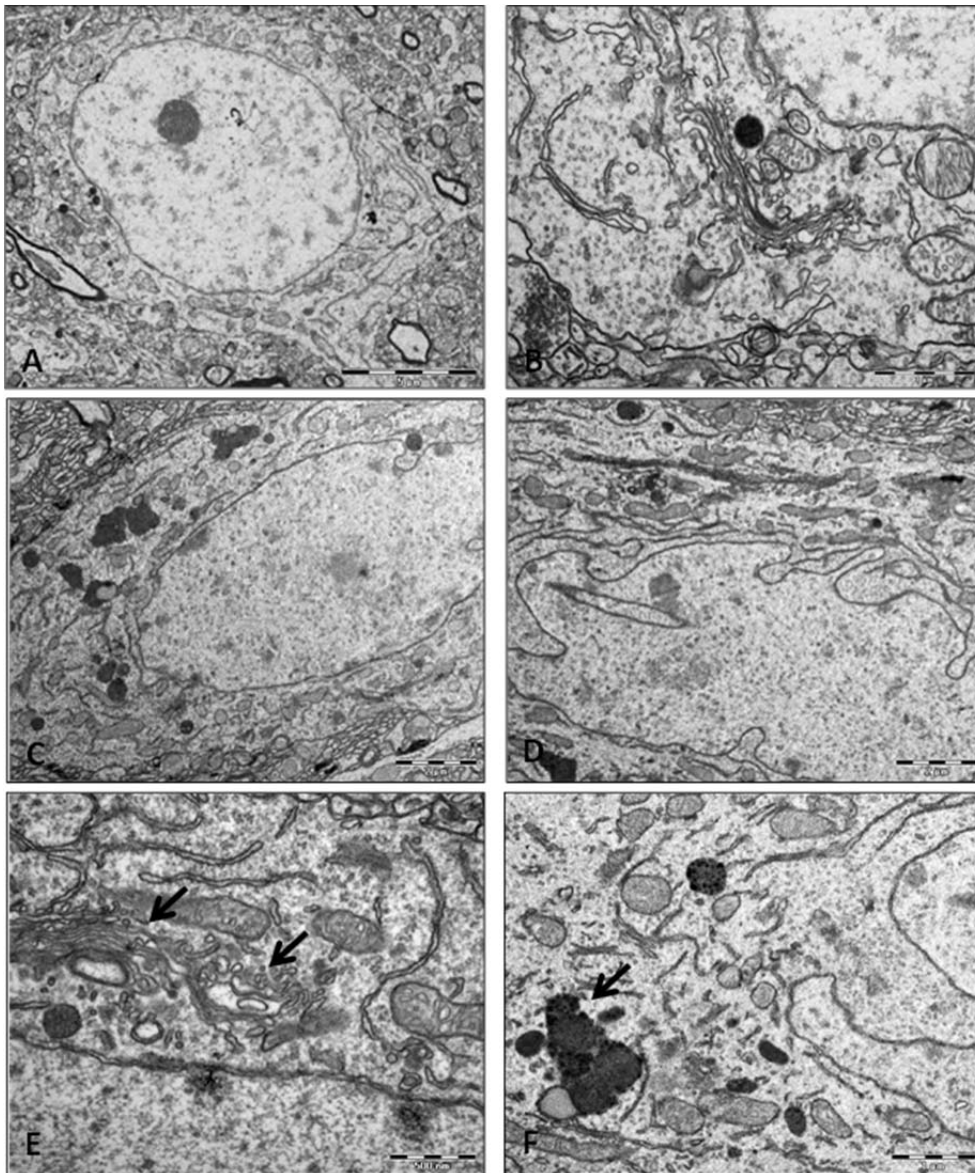


Figura 31: Imágenes de neuronas de la corteza motora por microscopía electrónica. A) Vista general de una neurona control (barra de escala (b.e.) = 5 μm). B) Detalle de la organización de los orgánulos en una neurona control (b.e. = 1 μm). C) Vista general de una neurona de un animal tratado que presenta gran número de fagolisosomas (señalados por flechas) (b.e. = 2 μm). D) Vista general de una neurona de un animal tratado que presenta grandes invaginaciones en la membrana nuclear (b.e. = 2 μm). E) Detalle del comienzo de la formación de autofagosomas (señalados por flechas), con las cisternas del aparato de Golgi envolviendo orgánulos degenerados (b.e. = 500 nm). F) Detalle del citoplasma neuronal en el que se aprecia el retículo endoplásmico fragmentado y la presencia de fagolisosomas (señalados por flechas) (b.e. = 1 μm).

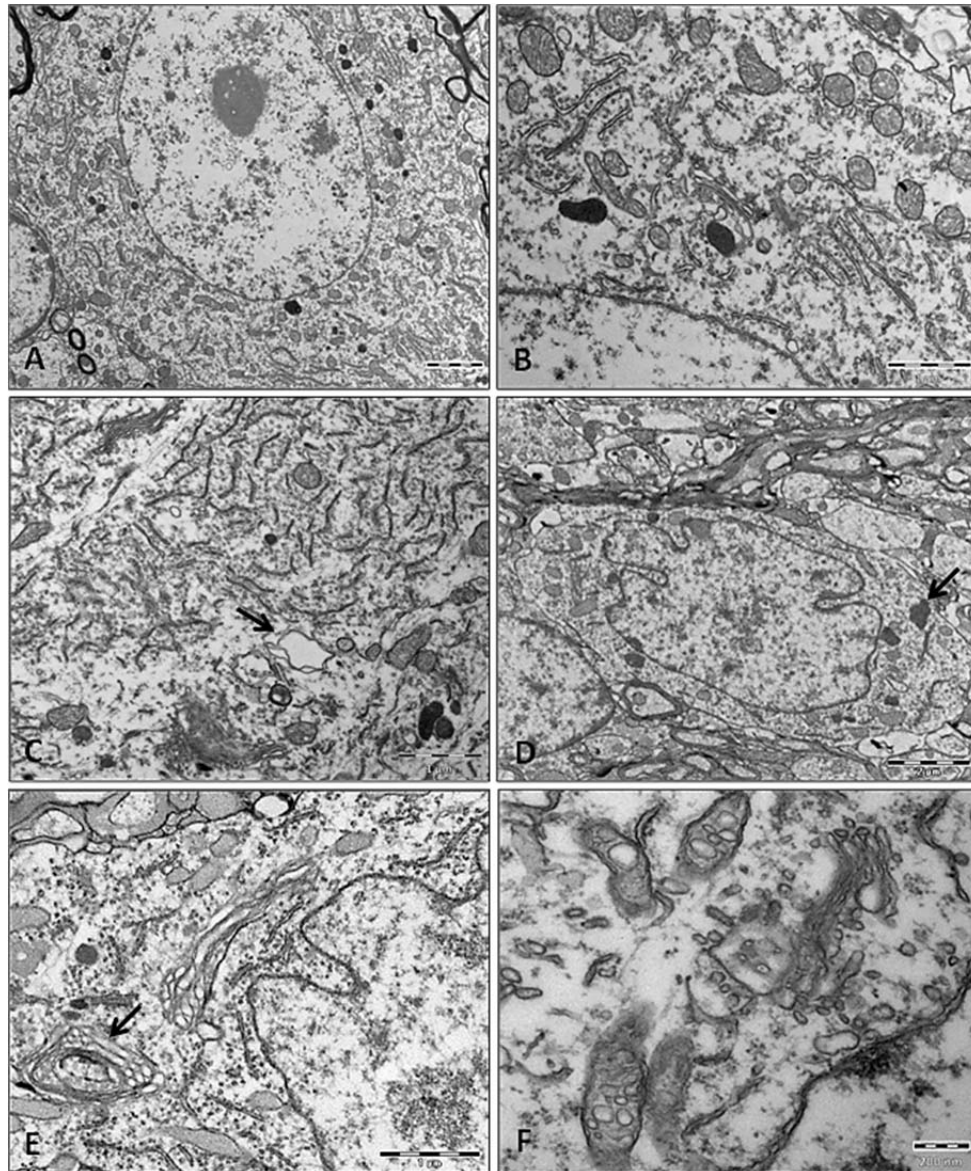


Figura 32: Imágenes de motoneuronas de la médula espinal lumbar por microscopía electrónica. A y B) Motoneurona control (b.e. = 2 μ m) y detalle de la organización normal de los orgánulos (b.e. = 1 μ m). C) Organización citoplásmica de una motoneurona de un animal tratado (b.e. = 2 μ m), con el retículo endoplásmico fragmentado y la presencia de mitocondrias degeneradas (señaladas por flechas). D) Motoneurona de un animal tratado con grandes invaginaciones en la membrana nuclear y con gran número de fagolisosomas (señalados por flechas) (b.e. = 2 μ m). E) Detalle de retículo endoplásmico desorganizado, punteado citoplásmico muy marcado y presencia de autofagosomas en proceso de formación (señalados por flechas) (b.e. = 1 μ m). F) Detalle de mitocondrias desorganizadas, con las crestas mitocondriales hinchadas (b.e. = 200 nm).

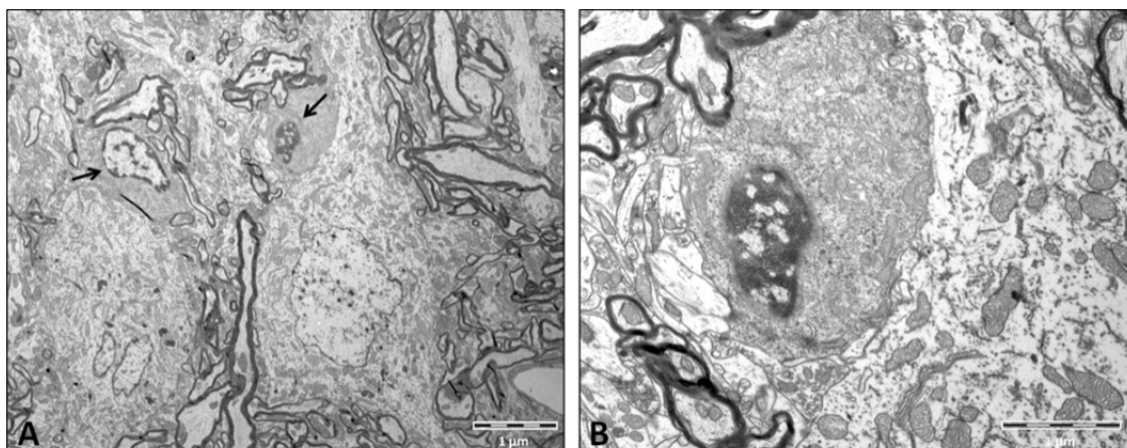


Figura 33: A) Vista general de una sección de médula espinal lumbar de una animal tratado (b.e. = 1 µm), en la que aparecen dos oligodendrocitos señalados por flechas. (B) Detalle de un oligodendrocito que presenta núcleo típicamente apoptótico (b.e. = 1 µm).

4.1. Procesos autofágicos

Los daños provocados por el tratamiento con L-BMAA indican la activación de procesos deletéreos para las neuronas incluyendo procesos autofágicos (como la formación de fagosomas observada por microscopía electrónica y descrita en el apartado 4.8). Para profundizar sobre el estudio de la activación de procesos autofágicos *in vivo*, se llevó a cabo el análisis de proteínas marcadoras de autofagia en corteza motora y médula espinal lumbar por western-blot e inmunofluorescencia.

Los análisis por western-blot revelaron que tanto en la corteza motora como en la médula espinal lumbar hay un incremento muy significativo de LC3B en comparación con los animales control (corteza: $t=5,969$, $p=0,027$; médula: $t=46,85$, $p=0,0005$) (figura 34A y B), por lo que se puede afirmar que existe una importante activación de la autofagia en los animales tratados con L-BMAA.

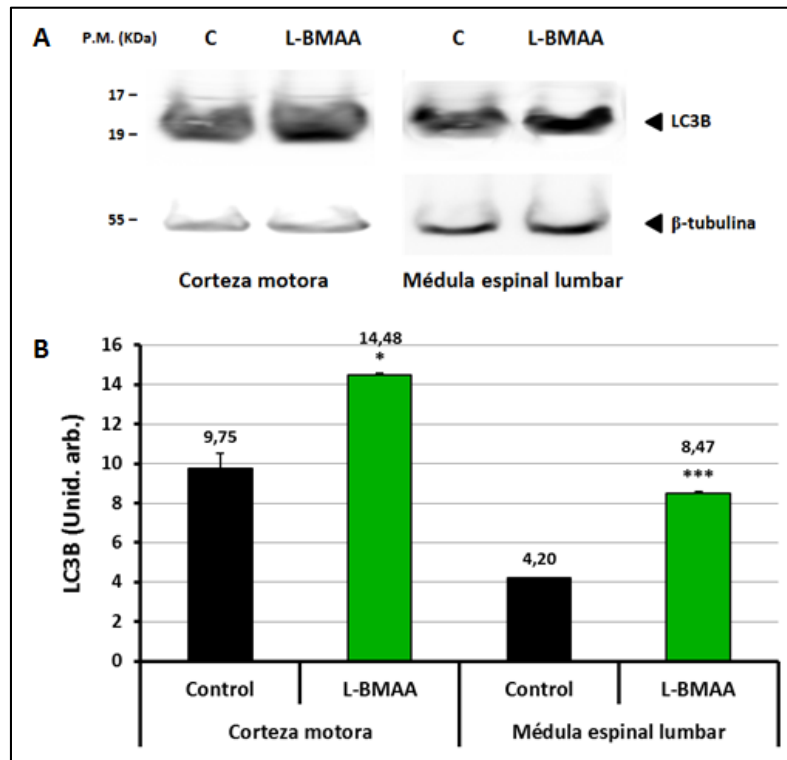


Figura 34: A) Análisis de LC3B por western-blot en la corteza motora y la médula espinal lumbar de animales control y animales tratados con L-BMAA. B) Las bandas de proteínas fueron cuantificadas, representándose los datos como el densitometrado de cada banda normalizado con β -tubulina. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados se cuantificaron en unidades arbitrarias como media \pm SEM. *,*** indican diferencias de p -valor $<0,05$ $<0,001$ con el grupo control, respectivamente.

Para averiguar la vía autofágica que desencadena el tratamiento con L-BMAA, se analizaron los niveles de P-mTOR, la forma inactiva de mTOR que aumenta cuando la vía autofágica es mTOR-dependiente. En el caso de los animales tratados con L-BMAA se observó un incremento de P-mTOR muy significativo en la corteza motora ($t=5,889$, $p=0,0042$) y significativo en la médula espinal lumbar ($t=3,257$, $p=0,031$) (figura35A y C).

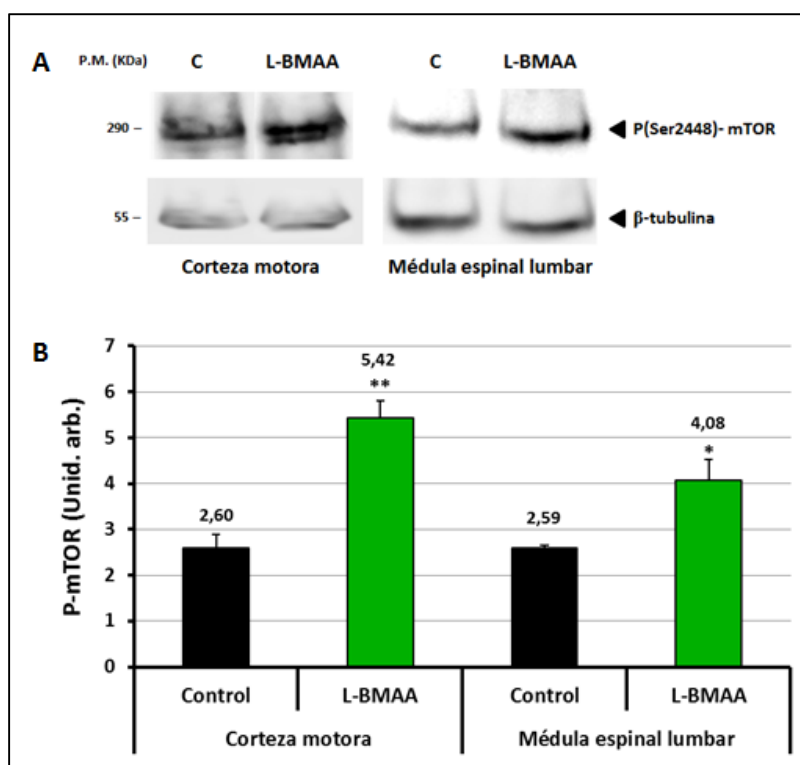


Figura 35: A) Análisis de P-mTOR por western-blot en la corteza motora y la médula espinal lumbar de animales control y animales tratados con L-BMAA. B) Las bandas de proteínas fueron cuantificadas, representándose los datos como el densitometrado de cada banda normalizado con β-tubulina. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados se cuantificaron en unidades arbitrarias como media \pm SEM. *, ** indican diferencias de p-valor $<0,05$ $<0,01$ con el grupo control, respectivamente.

Estos datos se constataron posteriormente en el análisis por inmunohistoquímica confocal, que además nos informa de la localización subcelular de las proteínas marcadas. Como se puede observar en las figuras 36 y 37, hay un gran aumento de la concentración de LC3B en las neuronas de la corteza motora y en las neuronas motoras de la médula espinal lumbar. Esta elevada concentración de LC3B se presenta como grandes acúmulos en el citoplasma celular (figuras 36E y 37E).

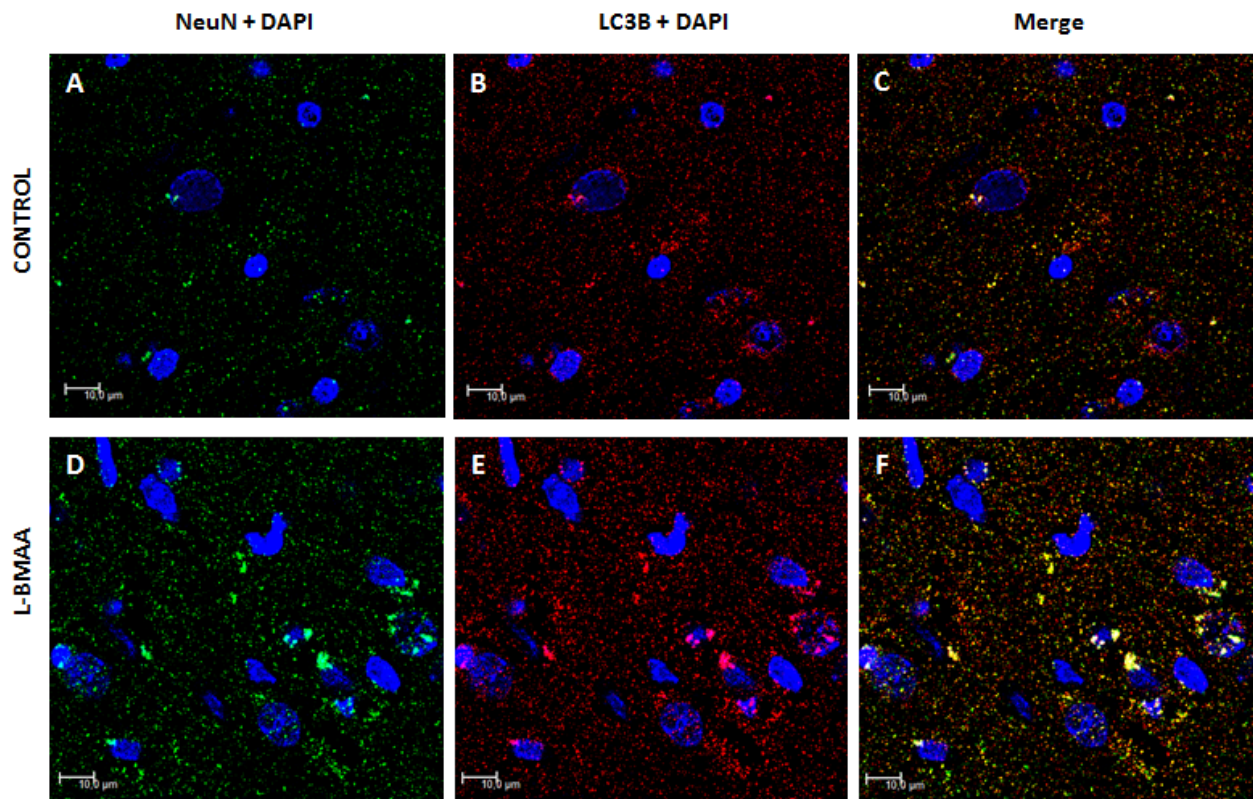


Figura 36: Imágenes representativas por microscopía confocal de la corteza motora, marcada en verde con anti-NeuN, en rojo con anti-LC3B y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control (b.e. = 10 µm). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se puede apreciar un importante incremento de la concentración de LC3B en el citosol de las neuronas corticales (b.e. = 10 µm).

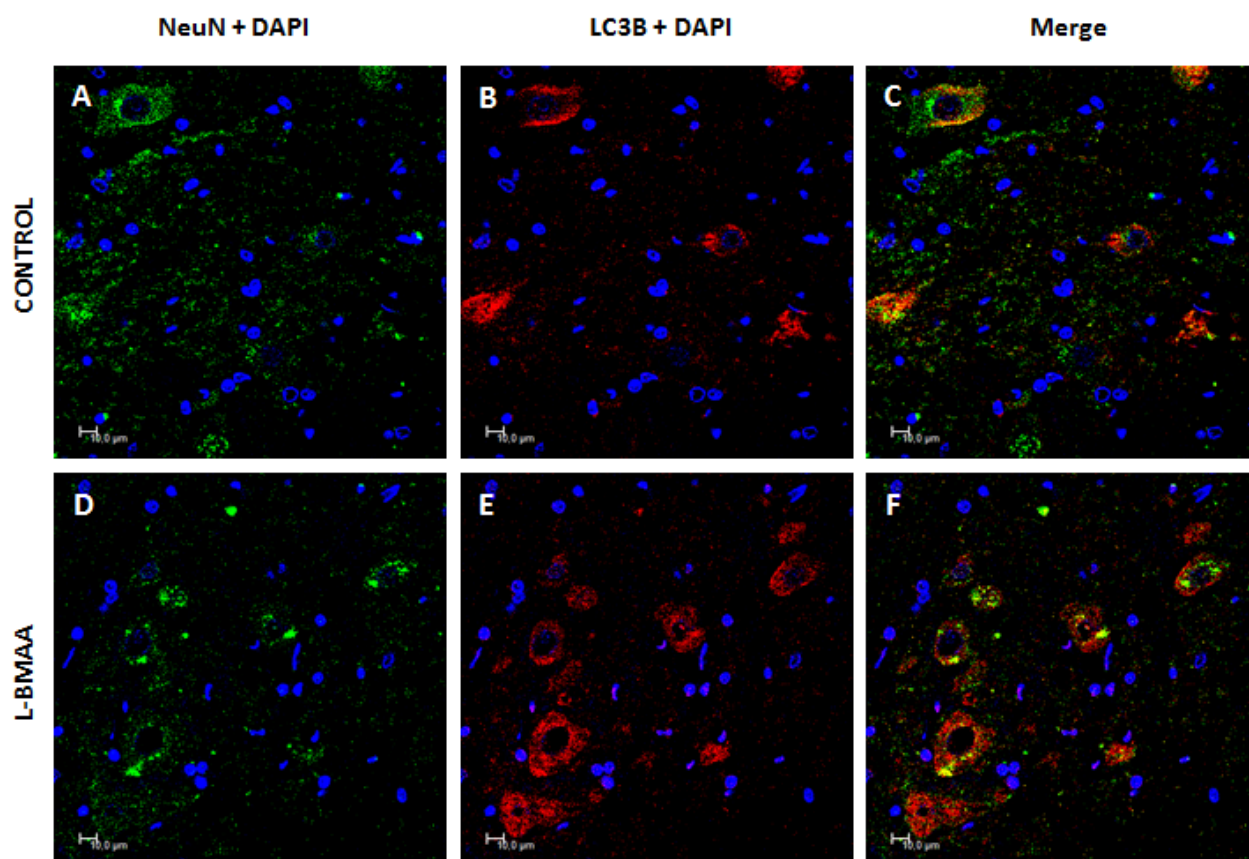


Figura 37: Imágenes representativas de la médula espinal lumbar obtenidas por microscopía confocal, marcada en verde con anti-NeuN, en rojo con anti-LC3B y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control (*b.e.* = 10 µm). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se puede apreciar un importante incremento de la concentración de LC3B en el citosol de las neuronas motoras (*b.e.* = 10 µm).

El incremento de P-mTOR también se corroboró en las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia. En el citosol de las neuronas de la corteza motora de animales tratados se puede observar un aumento del marcaje con anti-P-mTOR (figura 38E) en comparación con las imágenes obtenidas de animales control (figura 38B). En el caso de la médula espinal lumbar, este marcaje también es patente en el citosol de las motoneuronas en los animales tratados (figura 39E).

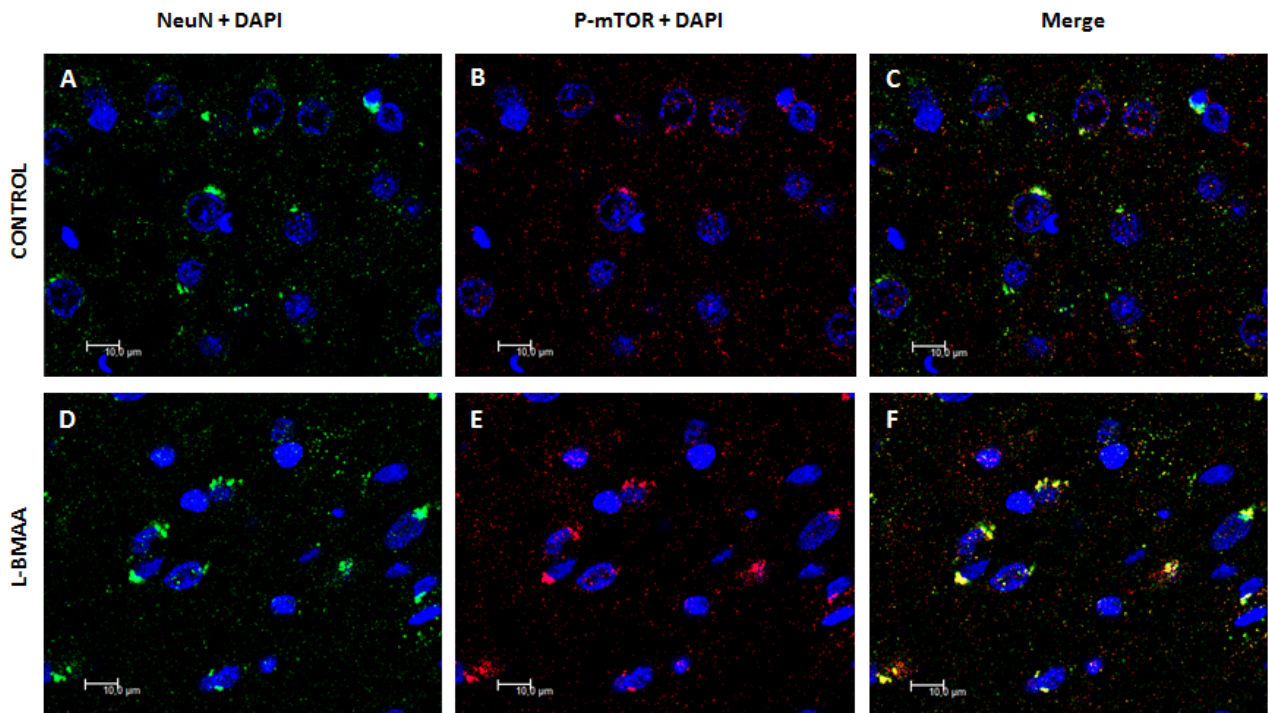


Figura 38: Imágenes representativas de la corteza motora obtenidas por microscopía confocal, marcada en verde con anti-NeuN, en rojo con anti-P(Ser2448)-mTOR y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control (b.e. = 10 μ m). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se puede apreciar un aumento del marcaje con P-mTOR en el citosol de las neuronas corticales (b.e. = 10 μ m).

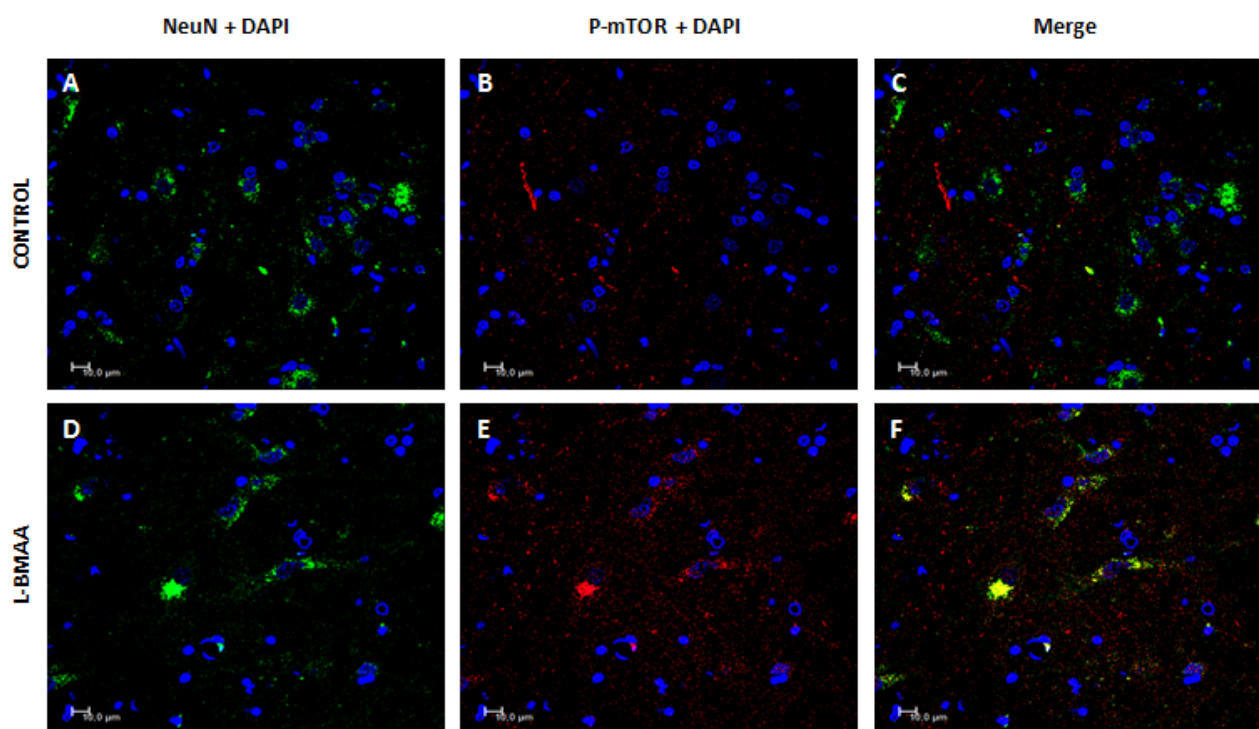


Figura 39: Imágenes representativas de la médula espinal lumbar obtenidas por microscopía confocal, marcada en verde con anti-NeuN, en rojo con anti-P(Ser2448)-mTOR y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control (b.e. = 10 μ m). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se puede apreciar un aumento del marcaje con P-mTOR en el citosol de las motoneuronas espinales (b.e. = 10 μ m).

4.9. Análisis de la muerte celular por apoptosis

Para comprobar si el L-BMAA provoca muerte celular por apoptosis en el tejido nervioso tras su administración *in vivo*, se analizó mediante inmunohistoquímica por microscopía electrónica la presencia de caspasa-3 activada. Este análisis se realizó sobre la corteza motora y la médula espinal.

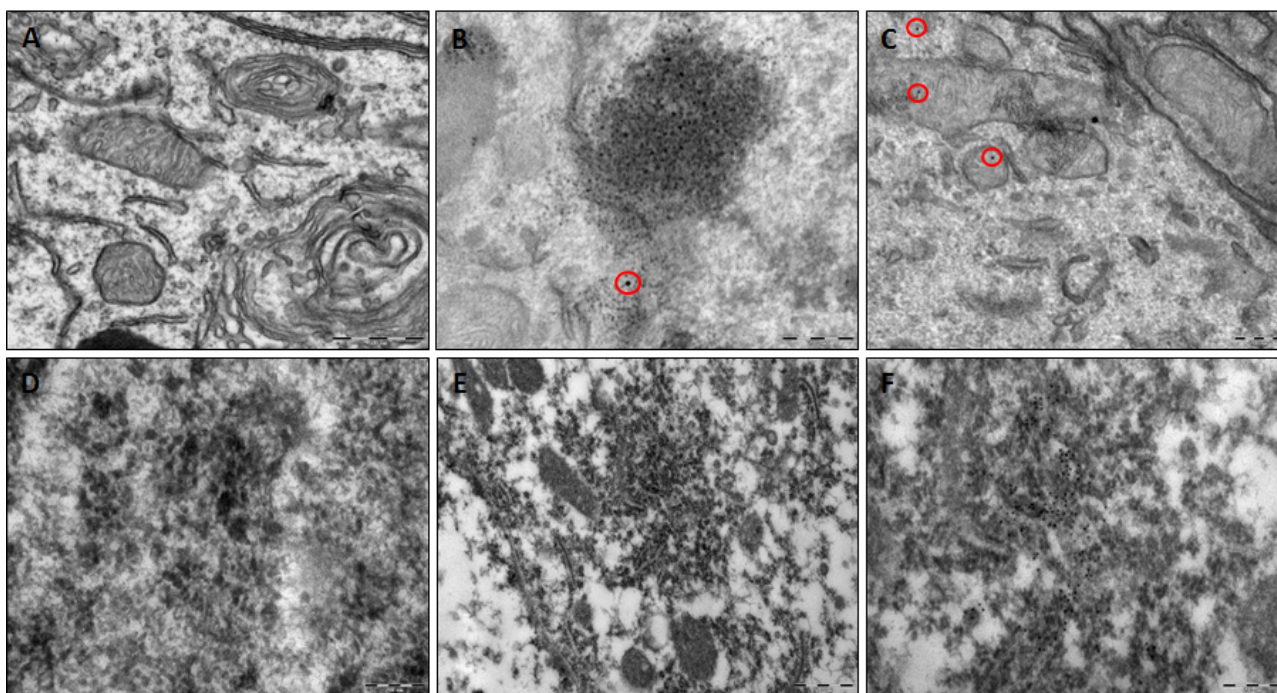


Figura 40: Análisis de caspasa-3 activada por microscopía electrónica. A) Imagen del citosol de una neurona de la corteza motora de un animal control en la que no se aprecia marcaje por caspasa-3 activa (b.e. = 500nm). B y C) Imágenes de neuronas de la corteza motora de animales tratados en las que se aprecia un ligero marcaje de caspasa-3 (señalado por círculos rojos) (b.e. = 200 nm). D) Imagen de una motoneurona de la médula espinal lumbar de un animal control en la que no se aprecia marcaje de caspasa-3 (b.e. = 200 nm). E y F) Imágenes de motoneuronas de la médula espinal lumbar de animales tratados en las que se aprecia un intenso marcaje de caspasa-3 (b.e.: E = 500 nm, F = 200 nm).

En el caso de la corteza motora (figura 40 A-C), no se encontró un gran aumento en el marcaje de caspasa-3 activada. Así pues, no parece haber una gran activación de la apoptosis en este tejido. Sin embargo, las motoneuronas de la médula espinal lumbar de los animales tratados (figura 40 E y F) si mostraban un marcaje muy intenso de

caspara-3 activada en comparación con los animales control (figura 40D), por lo que, en el caso de este tejido, si parece haber una gran activación de la apoptosis.

4.10. Alteraciones neuroquímicas en la corteza motora

Para estudiar las alteraciones neuroquímicas que causa el tratamiento *in vivo* con L-BMAA en la corteza motora se realizaron dos tipos de ensayos: por un lado se midieron los niveles de neurotransmisores a corto plazo tras el final del tratamiento mediante HPLC, dado que el L-BMAA es un aminoácido excitatorio, y por otro lado, para constatar si existen alteraciones en los sistemas de neurotransmisión a largo plazo, se midieron dichos niveles mediante espectrometría localizada.

4.10.1. Alteraciones neuroquímicas a corto plazo

En los ensayos a corto plazo se utilizaron ratas tratadas con L-BMAA un día postratamiento (PT1) y siete días postratamiento (PT7), y sus respectivos controles. Los grupos control a PT1 y a PT7 no mostraron diferencias significativas entre ellos, por lo que sólo se representa un grupo control en la figura 41 para simplificar la representación.

Como muestra el análisis de varianza, los niveles de glutamato (figura 41A) se ven alterados en la corteza motora de los animales tratados ($F=49,36$, $p=0,0005$). El Post-Test reveló que se produce un incremento muy significativo de la concentración de glutamato a PT1 ($t=8,120$, $p<0,01$) y altamente significativo a PT7 ($t=8,752$, $p<0,001$). No existen diferencias significativas entre los animales tratados en los dos momentos postratamiento examinados. Estos datos muestran que la concentración de glutamato se mantiene elevada una vez finalizado el tratamiento, por lo que el daño excitotóxico es prolongado.

Los niveles de GABA también se ven modificados significativamente por el tratamiento con L-BMAA ($F=24,70$, $p=0,0026$) (figura 41B). El análisis del post-test reveló que la concentración de GABA es significativamente menor tanto el día PT1 ($t=4,942$, $p<0,05$) como el día PT7 ($t=6,964$, $p<0,01$). No existen diferencias significativas en los niveles de GABA entre los dos días postratamiento. Estos resultados muestran que los niveles de

GABA disminuyen en la corteza motora de animales tratados con L-BMAA y esta disminución se mantiene una semana después de terminar el tratamiento.

La concentración de taurina se ve alterada significativamente en la corteza motora ($F=0,0007$, $p=44,44$) (figura 41C). Las muestras de corteza en el día PT1 muestran un incremento altamente significativo respecto a las muestras control ($t=9,421$, $p<0,001$) mientras que las muestras obtenidas en el día PT7 presentan un incremento significativo ($t=4,532$, $p<0,05$). Los niveles de taurina a PT1 son significativamente superiores que a PT7 ($t=3,894$, $p=0,05$). Por lo tanto, los niveles de taurina aumentan en respuesta al tratamiento con L-BMAA y se mantienen elevados una semana después del tratamiento, pero en menor medida que al finalizar el tratamiento.

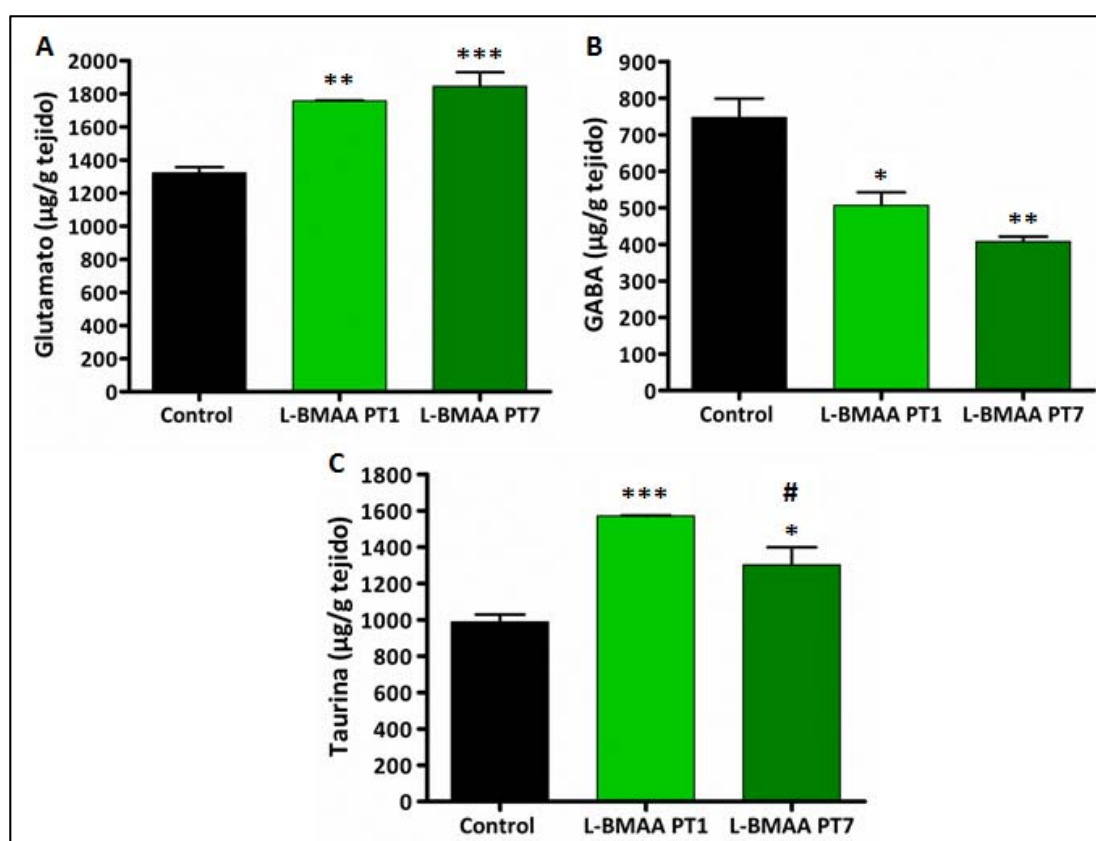


Figura 41: Concentración de neurotransmisores ($\mu\text{g/g}$ tejido) en la corteza motora de animales control y animales tratados con L-BMAA en el día postratamiento 1 (PT1) y en el día postratamiento 7 (PT7): A) Concentración de glutamato; B) Concentración de GABA; C) Concentración de taurina. *, **, *** indican diferencias de p -valor $<0,05$ $<0,01$ $<0,001$ con el grupo control, respectivamente. # indica diferencias de p -valor $<0,05$ entre los animales tratados con L-BMAA en el día PT1 y el día PT7.

4.10.2. Alteraciones neuroquímicas a largo plazo

En los ensayos a largo plazo se utilizaron ratas tratadas con L-BMAA a los 5 meses postratamiento y ratas control de la misma edad. La espectrometría localizada permitió observar la alteración de los niveles de los neurotransmisores en la corteza motora *in vivo* (figura 42).

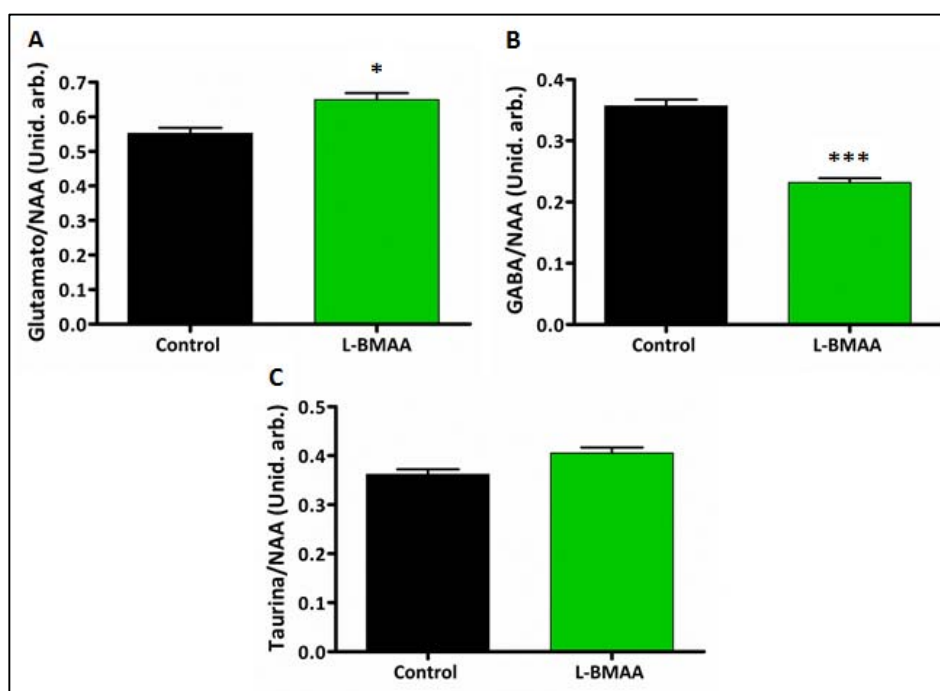


Figura 42: Nivel de neurotransmisores en la corteza motora de animales control y animales tratados con L-BMAA, a los 5 meses postratamiento. La valoración se referencia al nivel de NAA y se expresa en unidades arbitrarias. A) Concentración de glutamato; B) Concentración de GABA; C) Concentración de taurina. *,*** indican diferencias de p -valor $<0,05$ $<0,001$ con el grupo control, respectivamente.

En los animales tratados con L-BMAA, la concentración de glutamato es significativamente más alta que en los animales control ($t=3,986$, $p=0,0163$) (figura 42A), lo que indica que la alteración del sistema glutamatérgico se mantiene a largo plazo. Los niveles de GABA en los animales tratados son inferiores de forma altamente significativa ($t=10,17$, $p=0,0005$) que en los controles (figura 42B). Esto implica que la alteración del sistema GABAérgico se mantiene varios meses después de finalizar el tratamiento, por lo que el daño parece ser permanente.

Aunque no se observan diferencias significativas en la concentración de taurina con respecto al grupo control, si se aprecia cierta tendencia a mantenerse más alta en los animales tratados (figura 42C). Por lo tanto, la alteración en los niveles de taurina parece ser transitoria.

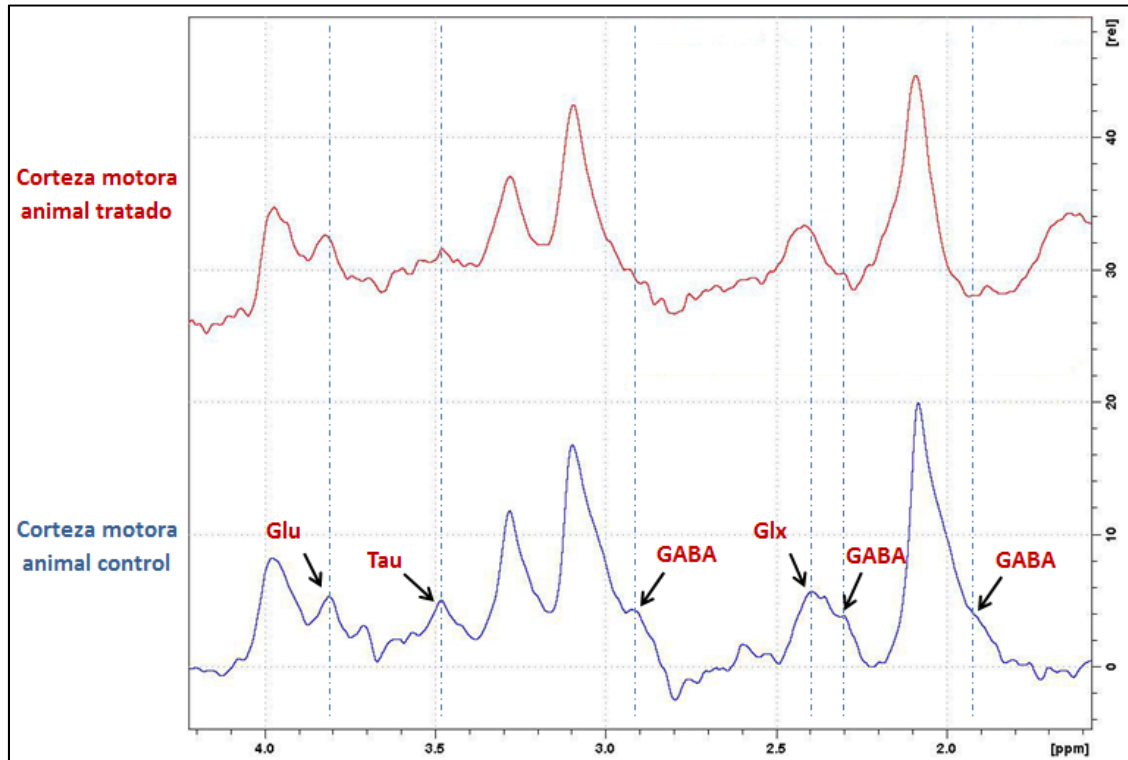


Figura 43: Espectro obtenido por espectroscopía localizada de un animal control y un animal tratados representativos. Se pueden observar los picos correspondientes a glutamato (Glu y Glx), GABA y taurina (Tau).

4.11. Alteraciones de GSK3 β

Dado que GSK3 β puede jugar un importante papel en los procesos neuropatológicos, se analizaron mediante western-blot (figura 45) e inmunohitoquímica confocal (figuras 46 y 47) las posibles alteraciones en los niveles tanto de GSK3 β total como de GSK3 β fosforilado en el residuo de serina 9 (P(Ser9)-GSK3 β).

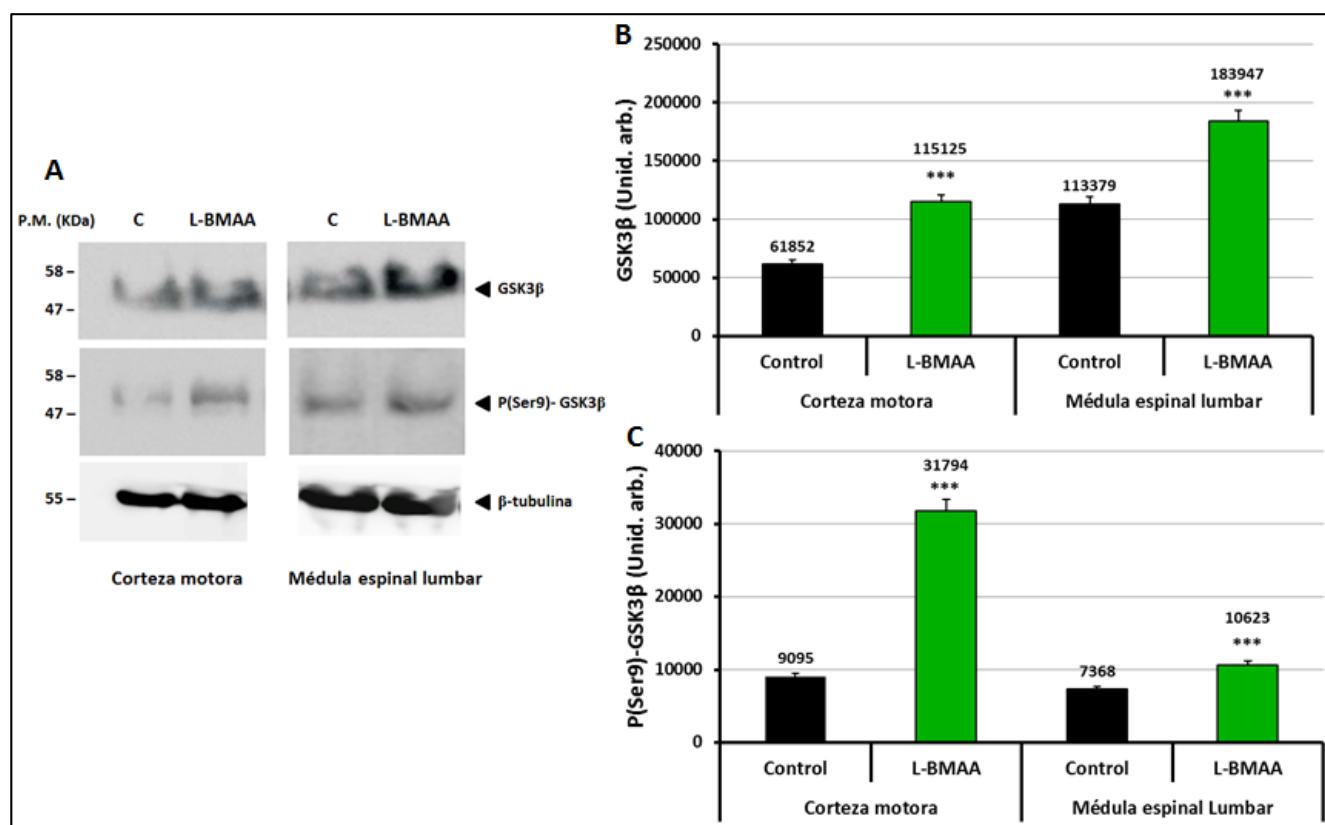


Figura 45: A) Análisis de GSK3 β total y P(Ser9)-GSK3 β por western-blot en la corteza motora y en la médula espinal lumbar de animales control y animales tratados con L-BMAA. B y C) Las bandas fueron cuantificadas, representándose los datos como el densitometrado de cada banda partido el densitometrado de la β -tubulina, como referencia de la cantidad de proteínas presentes en cada pocillo. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados se cuantificaron en unidades arbitrarias y fueron representados en las gráficas adjuntas como media \pm SEM. *** indican diferencias de p-valor $<0,001$ con el grupo control.

El densitometrado de las bandas obtenidas para el extracto total de corteza motora (figura 45 B y C), reveló la elevación altamente significativas en los niveles de GSK3 β total ($t=1197$, $p<0,0001$) así como en los niveles de P(Ser9)-GSK3 β ($t=2476$, $p<0,0001$) en los animales tratados con L-BMAA. Así mismo, las imágenes obtenidas por microscopía confocal (figura 46) nos muestran este gran aumento de GSK3 β total. A pesar del gran aumento de la porción fosforilada de la enzima, la porción activa de GSK3 β (estimada restando a la cantidad total la fracción fosforilada) aumenta alrededor de 58% en la corteza motora de los animales tratados con L-BMAA en comparación con los animales tratados.

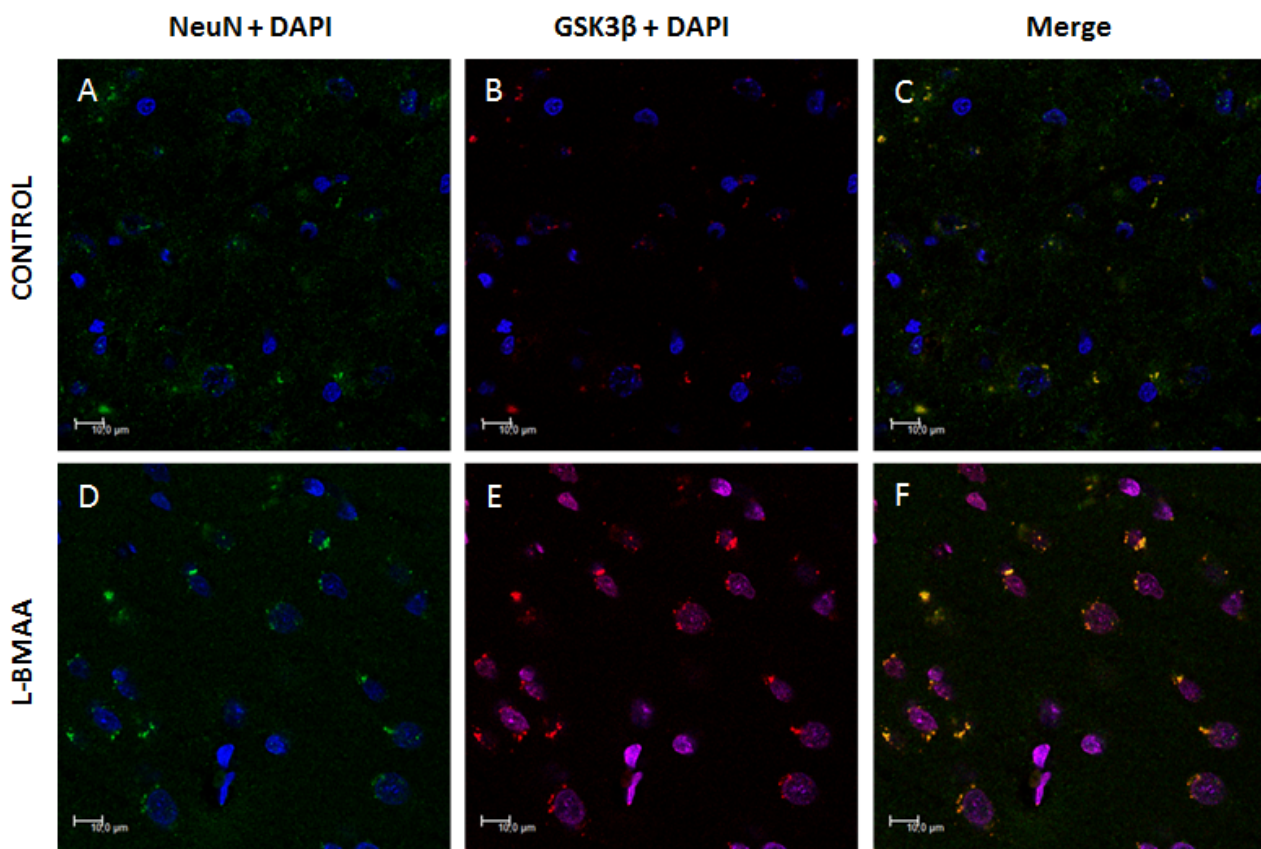


Figura 46: Imágenes por microscopía confocal de la corteza motora, marcada en verde con anti-NeuN, en rojo con anti-GSK3 β y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control en las que se observa un marcaje muy tenue de GSK3 β (b.e. = 10 μ m). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se puede apreciar un importante incremento de GSK3 β , sobre todo colocalizando con el marcaje azul de los núcleos (b.e. = 10 μ m).

En el caso de la médula espinal lumbar, también se aprecia este aumento altamente significativo de GSK3 β total ($t=2476$, $p<0,0001$) y de P(Ser9)-GSK3 β ($t=163,8$, $p<0,0001$) en los animales tratados (figura 45 B y C). La porción de GSK3 β activa aumenta más en este tejido que en la corteza motora, con casi un 64% de subida en los animales tratados respecto a los controles. El aumento de GSK3 β total se puede apreciar claramente en las imágenes obtenidas por inmunohistoquímica confocal, así como la presencia de agregados citoplásmicos (figura 47).

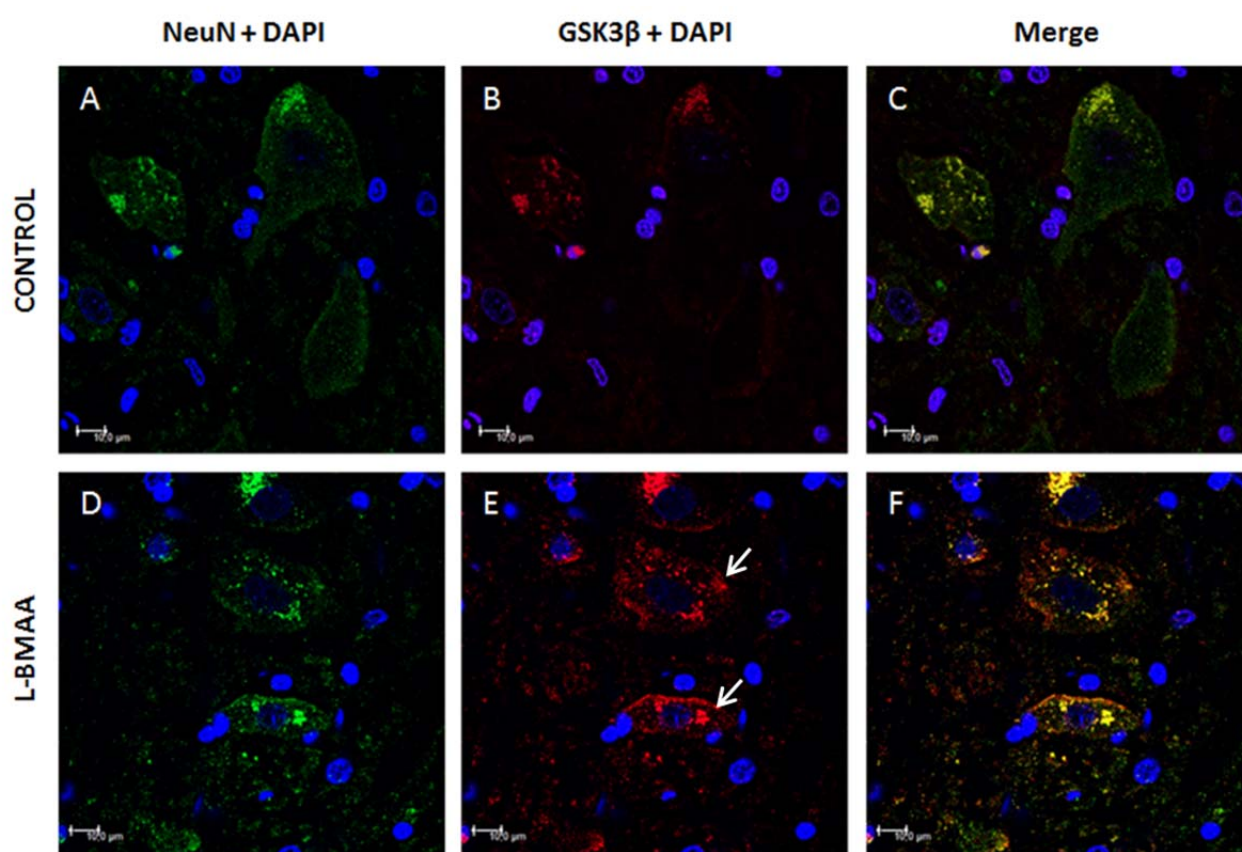


Figura 47: Imágenes por microscopía confocal de la médula espinal lumbar, marcada en verde con anti-NeuN, en rojo con anti-GSK3 β y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control en las que se observa un marcaje de GSK3 β de poca intensidad (b.e. = 10 μ m). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se puede apreciar un importante incremento de GSK3 β , formando grandes acúmulos en el citosol de las motoneuronas (señalados con flechas) (b.e. = 10 μ m).

Dado que en los animales control ya aparece una cantidad de GSK3 β más elevada en la médula espinal con respecto a la corteza motora, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica por microscopía electrónica para constatar la presencia de agregados citosólicos en la médula espinal de animales tratados y descartarla en el caso de los animales control (figura 48). Los resultados obtenidos muestran de nuevo la elevación de los niveles de GSK3 β en los tratados respecto a los controles, y constatan la presencia de agregados citosólicos sólo en el caso de los animales tratados.

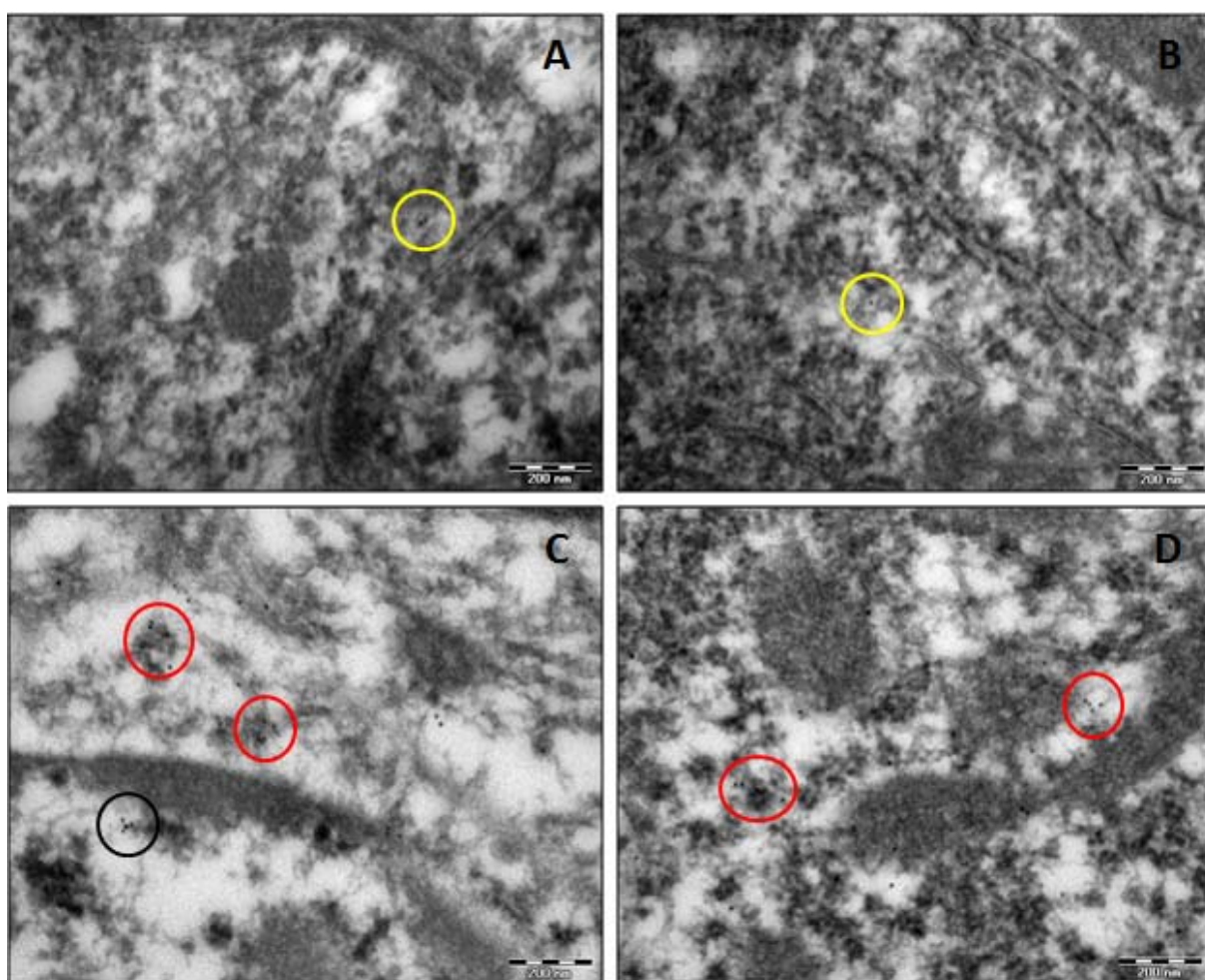


Figura 48: Motoneuronas de la médula espinal lumbar por inmunohistoquímica por microscopía electrónica marcadas con anti-GSK3 β . A-B) Imágenes representativas del marcaje de GSK3 β en motoneuronas control (b.e. = 200 nm) (marcaje en el citoplasma señalado por círculos amarillos). C-D) Imágenes representativas del marcaje de GSK3 β en motoneuronas de animales tratados (b.e. = 200 nm) (agregados marcados por círculos rojos en el citoplasma y por círculos negros en el núcleo).

A la vista de los resultados obtenidos, podemos deducir que el tratamiento *in vivo* con L-BMAA provoca el aumento de GSK3 β en los animales tratados tanto en la corteza motora como en la médula espinal lumbar.

4.12. Alteraciones de TDP-43

Dado el importante papel que juegan las alteraciones de TDP-43 en la ELA, se estudiaron los niveles de dicha proteína y sus formas alteradas, es decir, agregados de alto peso molecular, en el tejido nervioso de animales tratados con L-BMAA para encontrar un factor común entre dicha enfermedad y la acción de este neurotóxico.

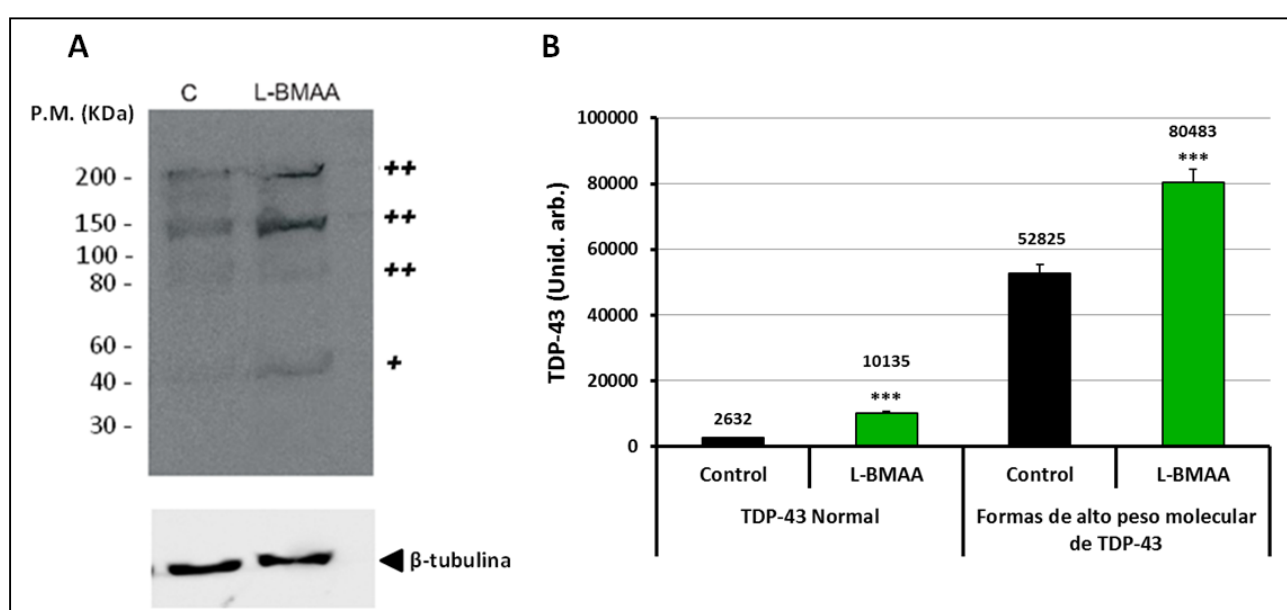


Figura 49: A) Análisis de TDP-43 por western-blot en extractos de urea de la corteza motora de animales control y animales tratados con L-BMAA. Se pueden observar varias especies distintas de TDP-43, incluyendo las bandas correspondientes al TDP-43 normal (+) y las bandas que corresponden a las formas de alto peso molecular de TDP-43 (++). B) Cuantificación de las bandas por densitometría, normalizando los datos respecto a la β -tubulina. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados fueron representados como media \pm SEM. *** indican diferencias de p-valor $<0,001$ con el grupo control.

Para el análisis de TDP-43 se realizó, en primer lugar, un estudio por western-blot de extractos de urea de la corteza motora de animales tratados con L-BMAA y sus respectivos controles. Como se muestra en la figura 49A, en los animales tratados

aparece un marcado incremento de TDP-43 y sus formas de alto peso molecular. El densitometrado de las bandas y su posterior análisis demostraron que dicho incremento es altamente significativo tanto para el TDP-43 normal ($t=159,5$, $p<0,0001$) como para las formas de alto peso molecular ($t=718,5$, $p<0,0001$) (figura 49B).

Este análisis también se llevó a cabo en el caso de la médula espinal lumbar. Sin embargo, no se consiguió hacer un extracto lo suficientemente purificado por lo que el western-blot no aportó resultados concluyentes (no se muestran los datos).

En segundo lugar, se investigó la presencia de agregados de TDP-43 con ubiquitina por inmunohistoquímica confocal en corteza motora y en médula espinal lumbar de animales tratados. Los resultados señalan un incremento generalizado de los agregados de TDP-43 que colocalizan con ubiquitina en la corteza motora de los animales tratados con respecto a los controles (figura 50).

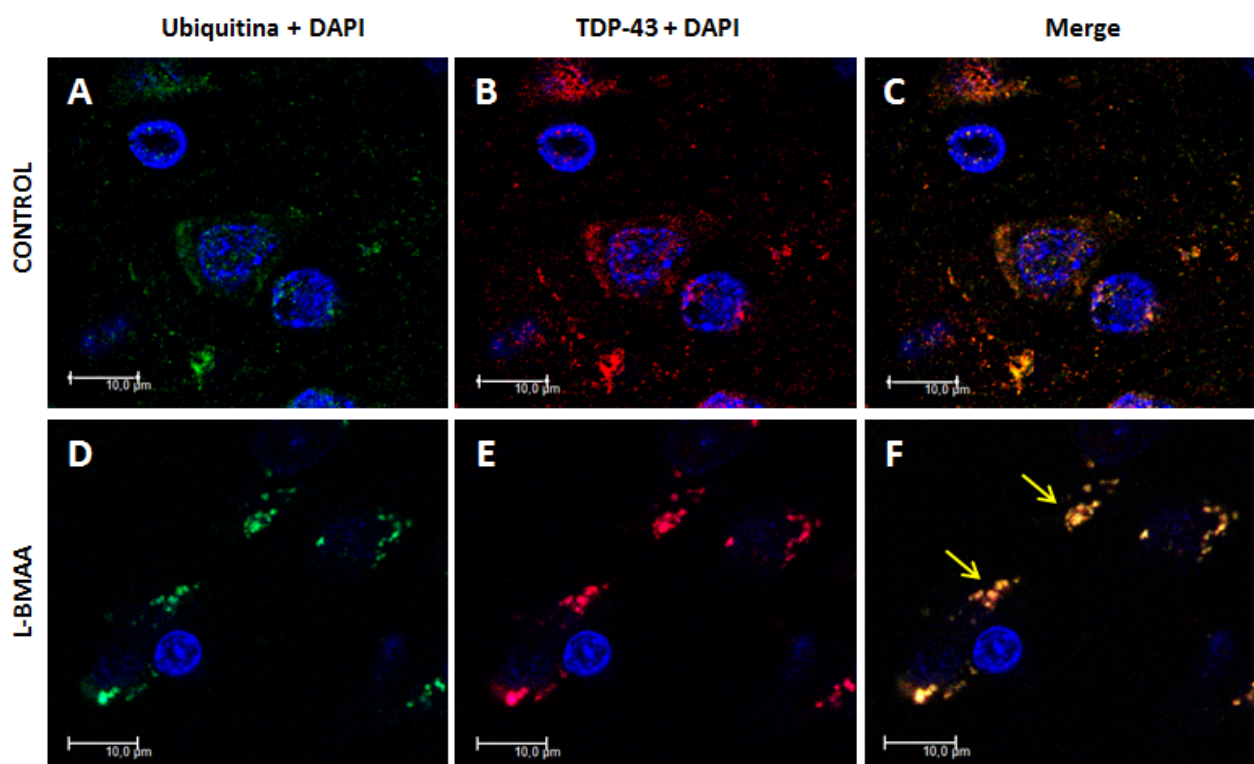


Figura 50: Imágenes por microscopía confocal de la corteza motora, marcada en verde con anti-Ubiquitina, en rojo con anti-TDP-43 y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control (b.e. = 10 µm). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se puede apreciar un importante incremento de

acúmulos de TDP-43 colocalizando con ubiquitina en el citosol de las neuronas corticales (señalados con flechas amarillas) (b.e. = 10 μ m).

Así mismo, las imágenes obtenidas en los cortes de médula espinal (figura 51) indican un gran incremento en el marcaje con TDP-43 y de la formación de agregados en los que colocalizan TDP-43 con ubiquitina y de agregados de ubiquitina sin TDP-43 en los animales tratados con L-BMAA.

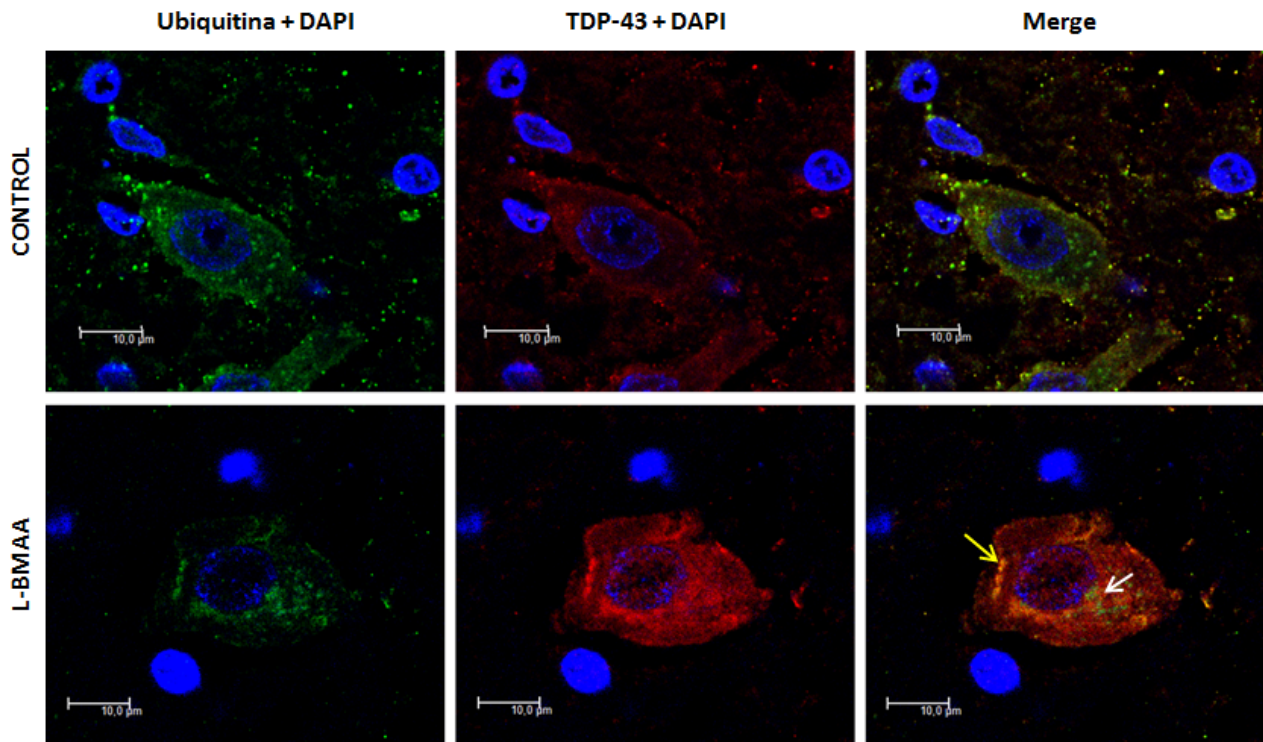


Figura 51: Imágenes por microscopía confocal de la médula espinal lumbar, marcada en verde con anti-ubiquitina, en rojo con anti-TDP-43 y en azul con DAPI. A-C) Imágenes obtenidas de un animal control (b.e. = 10 μ m). D-F) Imágenes obtenidas de un animal tratado con L-BMAA en las que se pueden apreciar agregados de TDP-43 que colocalizan con ubiquitina, en el citosol de las motoneuronas (señalados con flechas amarillas), así como acúmulos de ubiquitina citoplásmicos (señalados con flechas blancas) (b.e. = 10 μ m).

Finalmente, para confirmar la localización subcelular de TDP-43 se realizaron una serie de ensayos de inmunohistoquímica por microscopía electrónica tanto en corteza motora como en médula espinal. Los resultados obtenidos en ambos tejidos revelan que la mayoría del TDP-43 en los animales control se localiza en el núcleo (figura 52B) y no se encuentra apenas marcaje en el citosol (figuras 52A, 53 A y B). Sin embargo, en los animales tratados con L-BMAA hay un gran incremento de TDP-43 en el citosol tanto en corteza motora (figuras 52 C y D) como en la médula espinal (figuras 53 C y D). Además, este TDP-43 aparece muchas veces formando agregados.

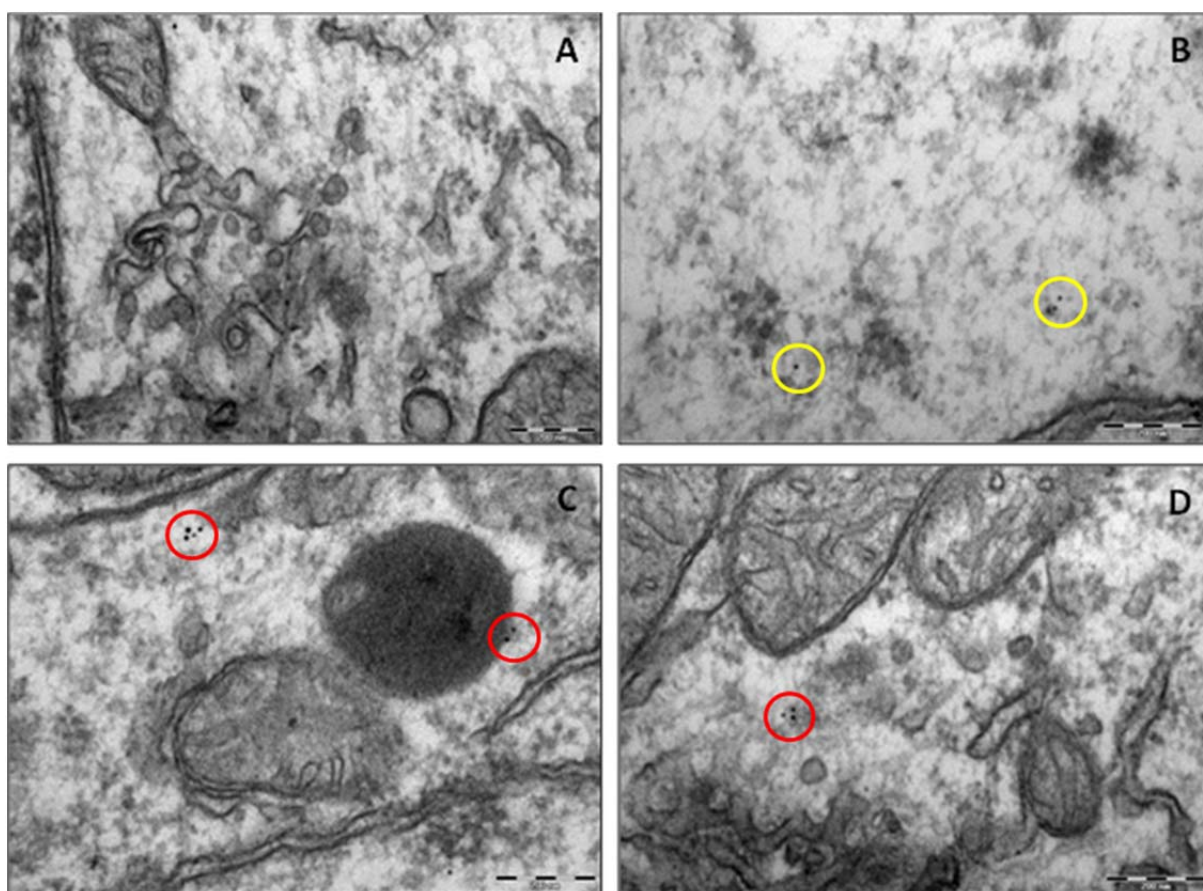


Figura 52: Imágenes de inmunohistoquímica por microscopía electrónica de neuronas de la corteza motora con anti-TDP-43 (b.e. = 200 nm). A-B) Imágenes representativas del marcaje de TDP-43 en neuronas control, en las que se observa un marcaje prácticamente inexistente en el citosol (A) y el marcaje habitual en el núcleo (B) (señalado por círculos amarillos). C-D) Imágenes representativas del marcaje de TDP-43 en motoneuronas de animales tratados (agregados marcados por círculos rojos en el citoplasma).

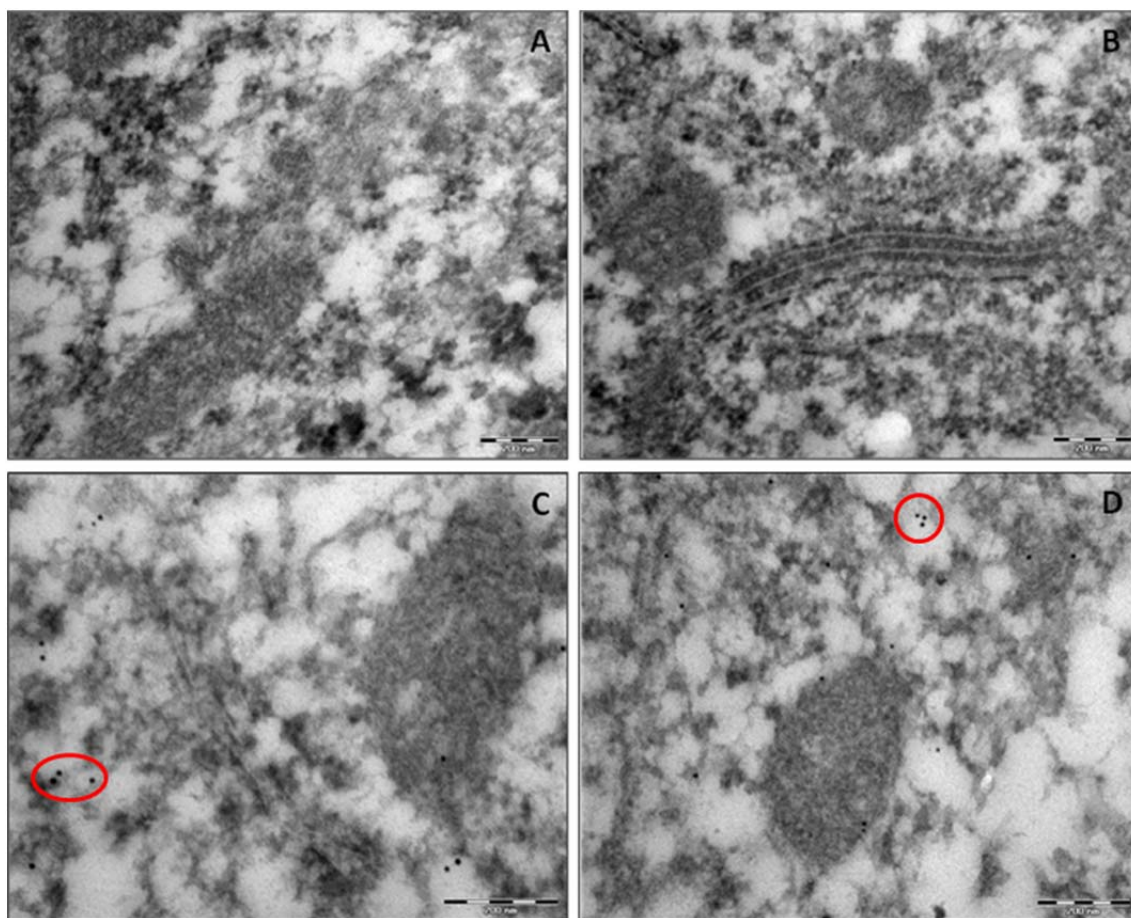


Figura 53: Imágenes de inmunohistoquímica por microscopía electrónica de motoneuronas de la médula espinal lumbar con anti-TDP-43 (barras de escala = 200 nm). A-B) Imágenes representativas de motoneuronas control en las que no se observa marcaje con TDP-43 en el citosol. C-D) Imágenes representativas del marcaje de TDP-43 en motoneuronas de animales tratados, se observa un aumento del marcaje de TDP-43 en el citosol (agregados señalados por círculos rojos).

4.13. Utilización de los animales tratados con L-BMAA en el ensayo de una molécula potencialmente terapéutica, VP2.51

Dado que uno de los fines de la puesta a punto de este modelo experimental es la búsqueda de moléculas potencialmente terapéuticas en los animales que presentan una sintomatología similar a la ELA por el tratamiento con L-BMAA, nos propusimos ensayar los efectos del compuesto VP2.51, inhibidor de GSK3 sintetizado por el grupo de la Dra. Ana Martínez del Instituto de Química Médica del CSIC. Para llevar a cabo este estudio, se realizó una planificación experimental tal y como se describe en el apartado 3.12 de materiales y métodos.

4.13.1. Control ponderal

Para respaldar los datos de seguridad farmacológica del VP2.51 y comprobar si el tratamiento con VP2.51 o con L-BMAA más VP2.51 afectaba al desarrollo normal de los animales se realizó un control del peso desde el momento del destete hasta el final del ensayo, incluyendo los distintos periodos de tratamiento (figura 54).

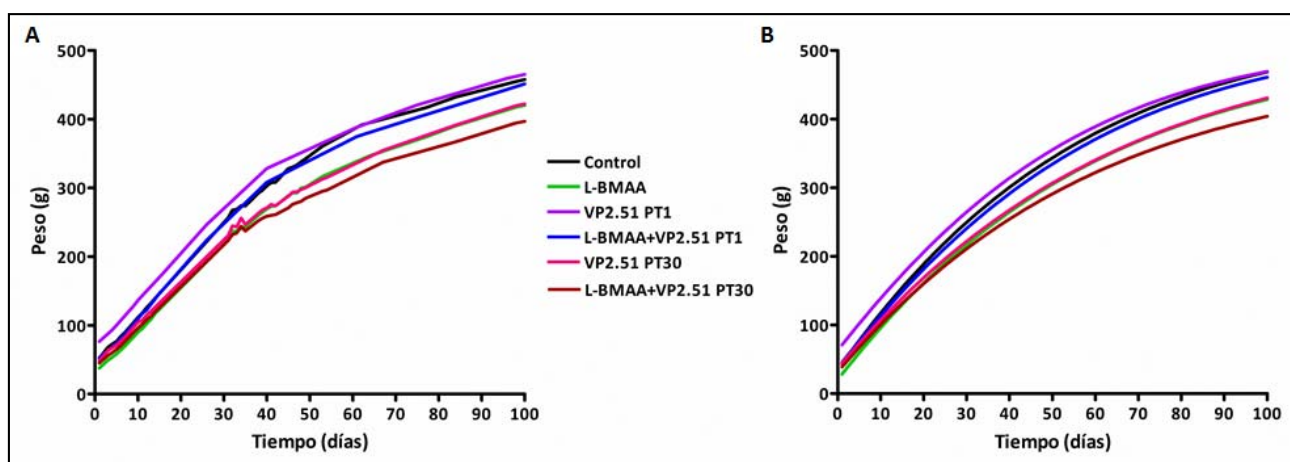


Figura 54: Control ponderal. A) Evolución del peso de los animales de los distintos grupos de tratamiento en el ensayo de protección con VP2.51: control, L-BMAA (300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos tratados al destete), VP2.51 (2,5 mg/kg durante 15 días) con un grupo tratado a PT1 y otro a PT30, L-BMAA + VP2.51 con un grupo tratado a PT1 y otro a PT30; B) ajuste sigmoide de Boltzmann realizado para analizar las diferencias entre grupos.

El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos, por lo que podemos deducir que el VP2.51 no afecta al desarrollo físico normal de las ratas, ni por sí sólo ni mediante su administración conjunta con L-BMAA.

4.13.2. Evaluación neurológica

La evolución de la evaluación neurológica de los distintos grupos tratados en este ensayo de protección con VP2.51 se muestra en la figura 55. Tanto el grupo control como los grupos tratados solamente con VP2.51, tuvieron una evaluación neurológica de cero a lo largo de todo el estudio por lo que no aparecen en la representación gráfica. Por lo tanto, el VP2.51 no causa alteraciones neurológicas en ninguno de los grupos experimentales.

Los animales tratados con L-BMAA al destete con 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, presentaron una evaluación neurológica inicial similar a la obtenida en otros grupos tratados con la misma dosis. El grupo tratado con VP2.51 (2,5 mg/kg/día durante 15 días) desde el día postratamiento 1 (PT1) tras las inyecciones con L-BMAA (L-BMAA+VP2.51 PT1), presentó diferencias altamente significativas en la evolución de la evaluación neurológica respecto al grupo tratado sólo con L-BMAA ($F=89,34$, $p<0,0001$). Estos animales mejoraron notablemente su evaluación neurológica, llegando casi a los niveles de animales control en 3 meses. Sin embargo, los animales tratados con VP2.51 desde el día postratamiento 30 tras las inyecciones con L-BMAA (L-BMAA+VP2.51 PT30), no presentaron diferencias significativas respecto a los animales tratados sólo con L-BMAA.

A la vista de estos resultados, el inhibidor de GSK3 β VP2.51 parece ser efectivo para contrarrestar los efectos deletéreos que produce la administración de L-BMAA sobre el sistema nervioso central, cuando se administra poco tiempo después de la exposición a esta toxina.

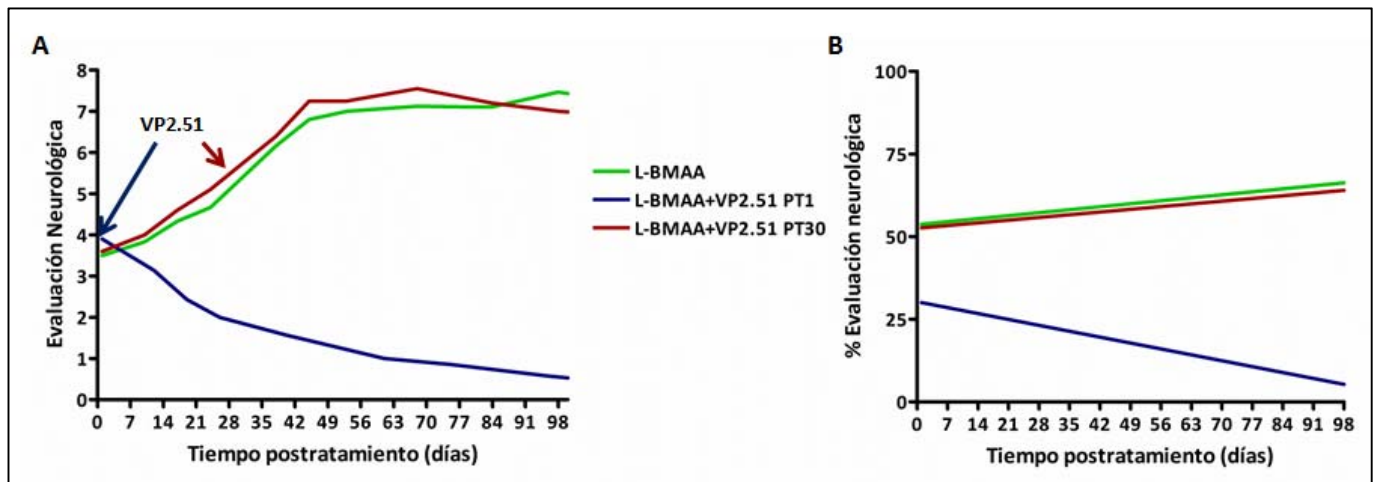


Figura 55: Evaluación neurológica. A) Evolución de la evaluación neurológica de los grupos de tratamiento en el ensayo de protección con VP2.51. B) Regresión lineal de los datos para su posterior análisis. El grupo control y los dos grupos tratados exclusivamente con VP2.51 (a PT1 y a PT30) no se muestran dado que su evaluación coincide con el eje de abscisas. El momento en el que se inicia el tratamiento con el inhibidor se encuentra señalado con flechas.

A la vista de estos resultados tan llamativos cuando se administra el protector en los primeros momentos de la acción tóxica del L-BMAA, nos propusimos comprobar si este inhibidor impedía también el importante incremento en la autofagia que habíamos observado en el tratamiento con L-BMAA. Así podríamos asegurar que los daños tanto en corteza motora como en médula, no se producen cuando se administra el inhibidor, implicando fuertemente a GSK3 en el desencadenamiento de la acción tóxica del L-BMAA.

4.13.3. Protección de la autofagia por VP2.51

Dado que el VP2.51 administrado a partir del día PT1 parece impedir los efectos del L-BMAA en la evaluación neurológica de los animales, se comprobaron los posibles efectos de este inhibidor de GSK3 β sobre la autofagia que causa el L-BMAA en la corteza motora y en la médula espinal lumbar. Como se describe en el apartado 3.12, los animales tratados con L-BMAA tienen unos niveles de LC3B y de P-mTOR significativamente mayores que los animales control en la corteza motora y en la médula espinal lumbar.

En el caso de los animales tratados sólo con VP2.51 a PT1, como control de los posibles efectos que pudiera tener este inhibidor por sí mismo, no se observaron diferencias respecto al grupo control en la corteza motora en los niveles de LC3B ni en los de P-mTOR (figuras 56 y 57).

Sin embargo, la ANOVA reveló la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos ($F=5,56$, $p=0,0234$). Los animales tratados con L-BMAA+VP2.51 a PT1 presentaron unos niveles de LC3B significativamente menores ($t=3,547$, $p<0,05$) que los animales tratados con L-BMAA, por lo que deducimos que el tratamiento con VP2.51 evita el incremento de la autofagia provocado por el L-BMAA.

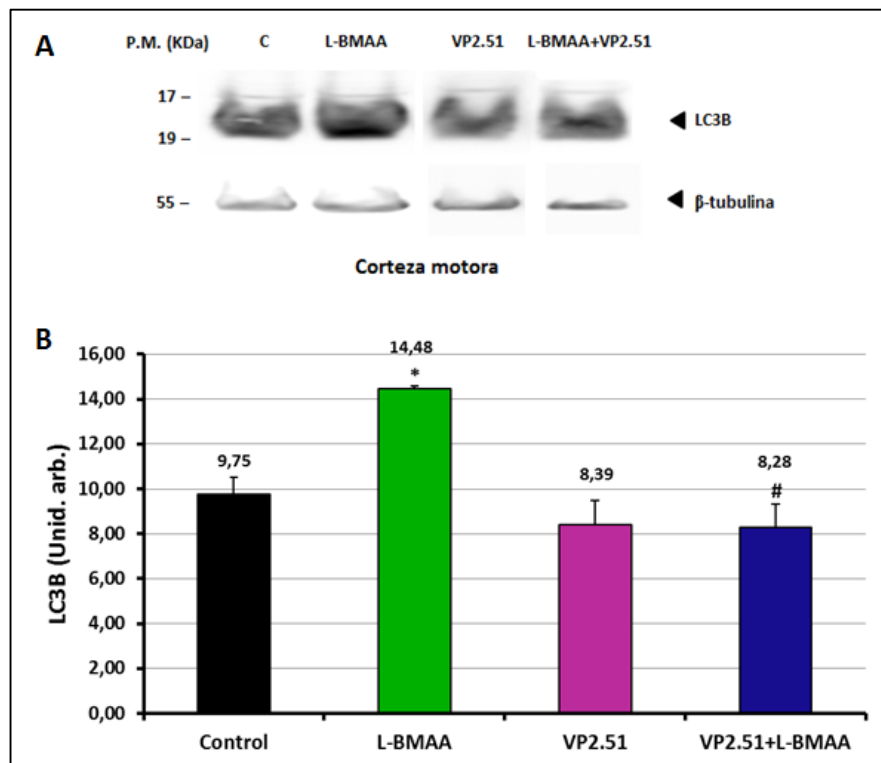


Figura 56: A) Análisis de LC3B por western-blot en la corteza motora de animales control y tratados en el ensayo de protección con VP2.51. B) Las bandas de proteínas fueron cuantificadas, representándose los datos como el densitometrado de cada banda normalizado con β -tubulina. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados se cuantificaron en unidades arbitrarias y fueron representados en las gráficas adjuntas como media \pm SEM. * indica diferencias de p -valor $<0,05$ con el grupo control. # indica diferencias de p -valor $<0,05$ con el grupo de animales tratados sólo con L-BMAA.

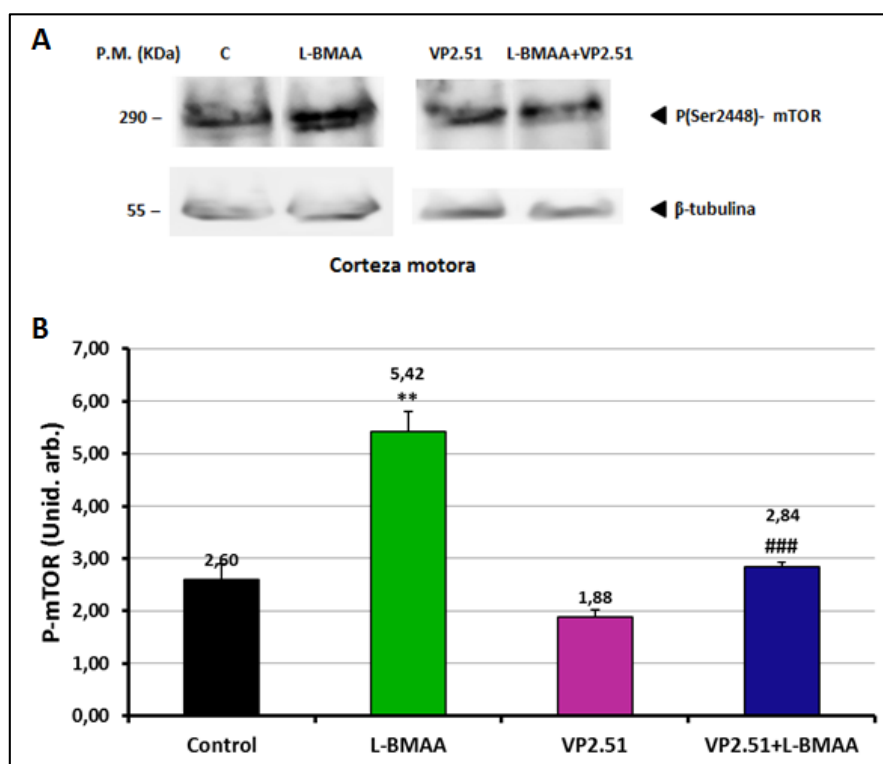


Figura 57: A) Análisis de P-mTOR por western-blot en la corteza motora de animales control y tratados en el ensayo de protección con VP2.51. B) Las bandas de proteínas fueron cuantificadas, representándose los datos como el densitometrado de cada banda normalizado con β -tubulina. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados se cuantificaron en unidades arbitrarias y fueron representados en las gráficas adjuntas como media \pm SEM. ** indica diferencias de p-valor $<0,01$ con el grupo control. ### indica diferencias de p-valor $<0,001$ con el grupo de animales tratados sólo con L-BMAA.

Los análisis de los niveles de LC3B en la médula espinal lumbar presentaron diferencias significativas ($F=13,12$, $p=0,0019$) (figura 58). El pos-test reveló que los animales tratados con VP2.51 a PT1 no mostraban diferencias respecto al grupo control. Si bien, se aprecia cierta tendencia a aumentar los niveles de LC3B con el tratamiento con VP2.51 respecto al control. Los animales tratados con L-BMAA+VP2.51 a PT1 presentaron unos niveles de LC3B significativamente menores ($t=5,083$, $p<0,01$) que los animales tratados sólo con L-BMAA, por lo que deducimos que el tratamiento con VP2.51 evita la autofagia provocada por esta toxina.

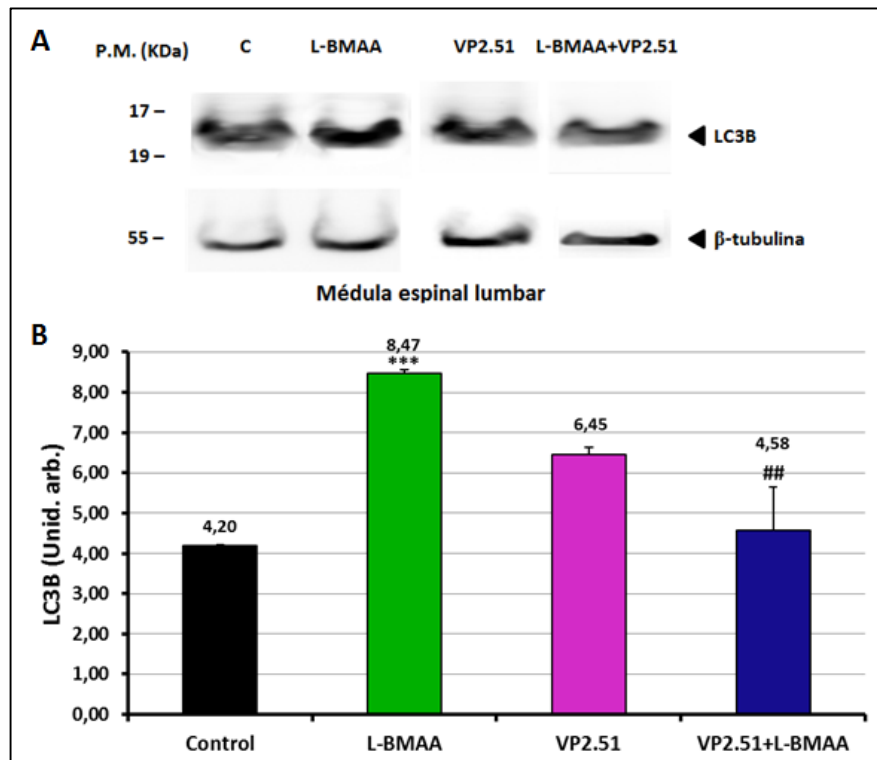


Figura 58: A) Análisis de LC3B por western-blot en la médula espinal lumbar de animales control y tratados en el ensayo de protección con VP2.51. B) Las bandas de proteínas fueron cuantificadas, representándose los datos como el densitometrado de cada banda normalizado con β -tubulina. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados se cuantificaron en unidades arbitrarias y fueron representados en las gráficas adjuntas como media \pm SEM. *** indica diferencias de p -valor $<0,001$ con el grupo control. ## indica diferencias de p -valor $<0,01$ con el grupo de animales tratados sólo con L-BMAA.

Los individuos tratados con VP2.51 no mostraron diferencias significativas en los niveles de P-mTOR respecto al grupo control, aunque se puede apreciar cierta elevación de dichos niveles. Los animales tratados con L-BMAA+VP2.51 a PT1 no presentaron diferencias significativas respecto a los animales tratados con L-BMAA, por lo que, en este caso del tratamiento con VP2.51 no parece afectar a esta vía autofágica (figura 59).

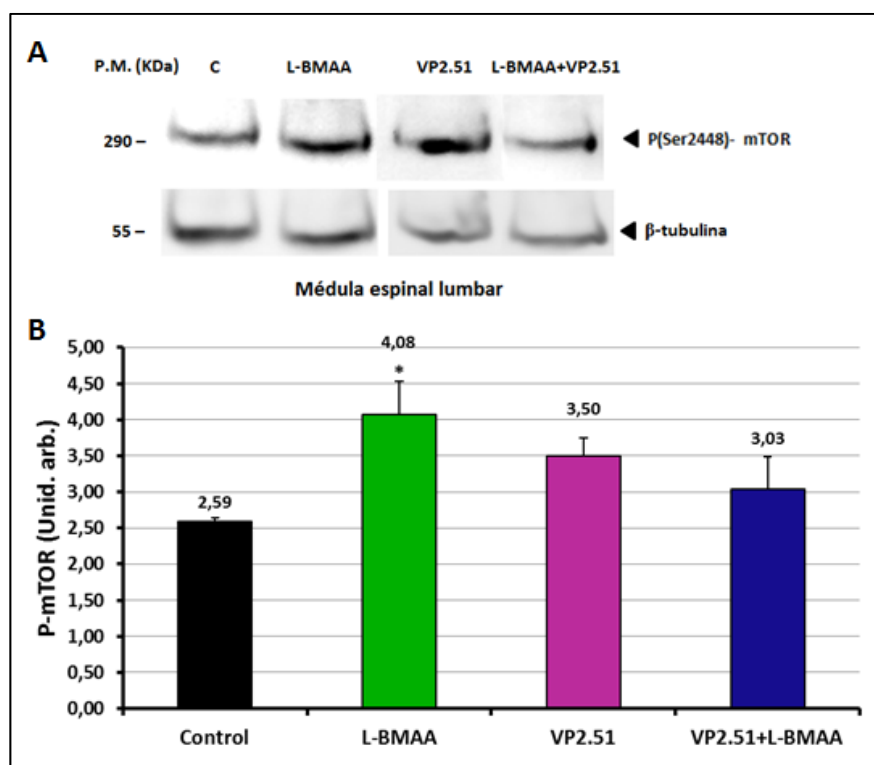


Figura 59: A) Análisis de P-mTOR por western-blot en la médula espinal lumbar de animales control y tratados en el ensayo de protección con VP2.51. B) Las bandas de proteínas fueron cuantificadas, representándose los datos como el densitometrado de cada banda normalizado con β -tubulina. Los inmunoblots son representativos de uno de tres experimentos con resultados similares. Estos resultados se cuantificaron en unidades arbitrarias y fueron representados en las gráficas adjuntas como media \pm SEM. * indica diferencias de p-valor $<0,05$ con el grupo control.

5. DISCUSIÓN

Desde mediados del siglo XX hasta nuestros días, la hipótesis de que el L-BMAA puede ser el causante de diversas enfermedades neurodegenerativas de etiología esporádica, especialmente la ELA, ha pasado por distintas fases de aceptación y rechazo sin que se haya alcanzado, en principio, un consenso sobre las concentraciones de este aminoácido en muestras biológicas o sobre su potencial para causar enfermedades neurodegenerativas. A pesar de ello, cada vez son más los estudios que describen la presencia de L-BMAA en concentraciones potencialmente dañinas en muy diversos ambientes y un mayor número de efectos deletéreos para el organismo.

Las cianobacterias son ubicuas y la mayoría de las especies examinadas hasta el momento producen el aminoácido neurotóxico L-BMAA (Cox *et al.*, 2005). Además, recientemente se ha descubierto que varias especies de diatomeas también lo producen (Jiang *et al.*, 2014). Dado que la exposición humana a este xenobiótico parece estar extendida, se ha argumentado que podría ser el principal factor medioambiental capaz de producir ELA y otras enfermedades neurodegenerativas en todo el mundo (Bradley y Mash, 2009).

Dado el interés suscitado por el L-BMAA, nuestra investigación se ha centrado en el análisis de la toxicidad de este aminoácido *in vivo* para correlacionar sus efectos tóxicos con síntomas similares a la ELA esporádica. De confirmarse dicha correlación, este estudio podría significar los primeros pasos hacia el desarrollo de un modelo *in vivo* de ELA esporádica.

5.1. El inicio del tratamiento con L-BMAA se lleva a cabo en el día 21 postnatal por vía intraperitoneal

Para la realización de este estudio, primero establecimos la edad más adecuada para llevar a cabo el tratamiento de los animales. Se descartó un tratamiento temprano en ratas neonatas, porque durante las tres primeras semanas después del nacimiento de los roedores se produce el llamado “*brain growth spurt*” (BGS), un periodo caracterizado por cambios rápidos en el desarrollo del cerebro, como el establecimiento de las conexiones neurales, la sinaptogénesis y la proliferación de

células gliales seguido de la mielinización (Davison y Dobbing, 1966). Karlsson *et al.* (2009 a, b) demostraron que el tratamiento con L-BMAA a ratas neonatas durante el pico del BGS (días posnatales 9-10) induce alteraciones agudas como la capacidad motora dañada e hiperactividad. Estas alteraciones pueden relacionarse con cambios en el sistema glutamatérgico. De hecho, Karlsson *et al.* (2012) observaron efectos permanentes a bajas dosis de L-BMAA en el hipocampo adulto, sugiriendo que el L-BMAA puede alterar, potencialmente, muchos procesos durante el desarrollo. Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, nosotros decidimos llevar a cabo los tratamientos fuera del BGS, a partir del día 21 posnatal, en el momento del destete.

Se han realizado gran cantidad de estudios que han demostrado que el L-BMAA puede causar efectos neurotóxicos *in vivo* (revisados en la tabla 1) mediante diversos sistemas de administración como son: por ingestión (Spencer *et al.*, 1987 a, b; Perry *et al.*, 1989; Cruz-Aguado *et al.*, 2006), por inyección intraperitoneal (Polsky *et al.*, 1972; Seawright *et al.*, 1990), inyección intracerebro-ventricular (Rakonczay *et al.*, 1991; Matsuoka *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1993) o inyectado intraestriatalmente (Santiago *et al.*, 2006; Buenz y Howe, 2007), entre otros. Para que nuestro sistema de administración fuera lo más fácilmente reproducible y lo menos agresivo posible, se eligió tratar a los animales mediante inyección intraperitoneal.

Los estudios de Smith *et al.* (1992) demostraron que el L-BMAA inyectado es conducido al cerebro por el receptor de aminoácidos neutros grandes de la vasculatura cerebral. Una vez allí, se forma el β -carbamato de L-BMAA debido a la presencia de bicarbonato en el fluido intersticial del cerebro. Si se inyecta el L-BMAA disuelto en una solución de bicarbonato para aumentar la proporción de β -carbamato (molécula que presumiblemente causa la activación de los receptores de glutamato), se puede entorpecer su paso hacia el cerebro. Esto se debe a que el β -carbamato de L-BMAA es un isómero estructural del L-glutamato, y este neurotransmisor tiene un flujo pasivo de entrada al cerebro a través de la BHE muy limitado, que es menos del 1% del que ocurre en los vasos sanguíneos de otros tejidos (Smith *et al.*, 2000). Por lo tanto, en este estudio se decidió disolver el L-BMAA en PBS, de forma que una mayor cantidad de este aminoácido pudiera llegar al tejido nervioso.

Respecto a las dosis ensayadas en el tratamiento *in vivo* de los animales, tras realizar una extensa revisión de las dosis administradas por otros autores (Vega *et al.* 1968; Polsky *et al.*, 1972; Seawright *et al.*, 1990), optamos por realizar los ensayos con dosis más bajas, entre los 50 y los 600 mg/kg/día, dado que una de las principales críticas a los estudios con L-BMAA *in vivo* ha sido la utilización de dosis que se consideraban muy altas. Aun así, tal y como señalan Karamyan y Speth (2008) en una extensa revisión sobre los ensayos *in vivo* con L-BMAA, es un hecho aceptado que en la extrapolación de la dosis efectiva de una droga o un tóxico de un animal grande a un animal significativamente más pequeño (en este caso de humanos a ratas), la dosis aplicada en el animal pequeño para producir un efecto comparable debe ser varias veces superior que la aplicada al animal grande.

Además, en los ensayos realizados por los autores mencionados anteriormente (Vega *et al.* 1968; Polsky *et al.*, 1972; Seawright *et al.*, 1990) con dosis agudas (1-2 inyecciones) sólo se obtuvieron efectos a muy corto plazo (unas horas o unos días). Por lo tanto, los tratamientos con L-BMAA seleccionados se realizaron durante periodos de 5 o 10 días, con el objetivo de conseguir un efecto acumulativo que se prolongase más allá del periodo de tratamiento.

5.2. El tratamiento con L-BMAA no afecta a la evolución ponderal de los animales

Para llevar a cabo este estudio, lo primero que quisimos comprobar fue si el L-BMAA causaba algún efecto sobre el desarrollo normal de las ratas tratadas, dado que este hecho podría interferir en la observación posterior de los efectos neurológicos que provoca esta toxina. La valoración del progreso del peso de los animales mostró que el tratamiento con L-BMAA, tanto en el momento del destete como al mes de edad, no afecta a la evolución del peso, por lo que el desarrollo físico general no parece verse alterado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Karlsson *et al.* (2009 a, b) tras el tratamiento con L-BMAA (en concentraciones similares a las empleadas en nuestro ensayo) a ratas neonatas. Estos resultados nos permiten descartar la posibilidad de que el tratamiento cause déficits nutricionales, parámetro muy importante dado que el momento del destete es un momento clave en el desarrollo de los animales.

5.3. El daño neurológico buscado se consigue administrando una dosis de 300 mg/kg/día, durante 5 días consecutivos desde el momento del destete

Para alcanzar un daño neurológico en un periodo relativamente breve y que se prolongase en el tiempo, es decir, que sea crónico, se ensayaron varios tratamientos con el L-BMAA siguiendo las premisas descritas anteriormente. Con el fin de poder analizar con más detalle el estado de afectación motora de los animales tratados, se desarrolló en nuestro laboratorio una escala de evaluación neurológica (descrita en la tabla 3), mediante la comparación de los animales control (que se tomó como nivel normal o 0) con los distintos grupos de animales tratados en la realización de los test que conforman la evaluación neurológica. Esta escala es novedosa en el estudio de los efectos causados por esta toxina *in vivo* y resulta una herramienta útil para valorar el grado de afectación de los animales tratados.

El objetivo inicial era seleccionar la dosis más adecuada para alcanzar los efectos neurológicos deseados en los animales de experimentación. De esta forma, las dosis más bajas, 50-100 mg/kg/día, fueron descartadas puesto que producían efectos neurológicos leves. Así mismo se descartó la dosis de 600 mg/kg dado que los efectos neurológicos eran demasiado severos, conduciendo en algunos casos a la muerte de los animales durante el tratamiento debido a la incapacidad para alimentarse y beber por sí solos. Nuestros resultados mostraron que la dosis más efectiva para conseguir los efectos buscados se encuentra entre los 200 y los 300 mg/kg/día, inyectando a los animales diariamente durante 5 días consecutivos desde el momento del destete (figura 11).

Como muestran los resultados (figura 12), comparando un grupo tratado en el momento del destete (21 días posnatales) con otro tratado con la misma dosis con un mes de edad, los animales parecen ser más sensibles a la toxina en el momento del destete. Esto puede deberse a que los receptores de glutamato y sus subunidades son regulados diferencialmente durante el desarrollo, con distintos perfiles regionales y temporales de expresión, a menudo con picos de expresión transitorios durante las primeras semanas posnatales en las ratas (Karlsson *et al.*, 2009 b, 2012). Una característica importante de las motoneuronas, que ha sido propuesta como causa de

su vulnerabilidad selectiva en determinadas enfermedades neurodegenerativas, es la composición de sus receptores NMDA, que determina sus propiedades funcionales y farmacológicas (Cowan y Raymond, 2006). Existen evidencias que sugieren que el glutamato causa muerte excitotóxica predominantemente mediante la activación de los receptores NMDA extrasinápticos que contienen subunidades NR2B (Hardingham *et al.*, 2002). En muchas regiones del cerebro el patrón de desarrollo común es de una elevada expresión de subunidades NR2B temprano en el desarrollo y, con la maduración, una bajada en los niveles de expresión de NR2B y un incremento en los de NR2A (Monyer *et al.*, 1994; Sans *et al.*, 2000). Los receptores NMDA que contienen subunidades NR2B se desactivan de forma más lenta que los receptores compuestos por NR1/NR2A (Chen *et al.*, 1999), lo que puede conducir a una corriente de Ca^{2+} prolongada y conferir a la neurona una vulnerabilidad incrementada a al estímulo excitotóxico (Cowan y Raymond, 2006). Por lo tanto, es posible que la gran susceptibilidad hacia el L-BMAA durante las primeras semanas de vida pueda estar relacionada con el pico de expresión de estas subunidades de los receptores NMDA de glutamato.

Los déficits neurológicos observados en nuestros animales, desde el día 1 postratamiento tratándoles al destete con L-BMAA, se pueden deber a una activación inicial de los receptores de glutamato que conduciría a la excitotoxicidad. El daño neuronal y la toxicidad del L-BMAA mediada a través de los receptores de glutamato ha sido demostrada en diversos estudios *in vitro* (Cucchiaroni *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2006) y la acción directa de este aminoácido sobre los receptores de glutamato se ha constatado también *in vivo* (Goto *et al.*, 2012).

En cuanto a la duración del tratamiento, los ensayos con animales tratados al destete con 200 mg/kg/día, demostraron que no existen diferencias significativas entre un grupo tratado durante 5 días consecutivos y un grupo tratado durante 10 días (figura 13). Estos resultados siguen el mismo patrón que los obtenidos por Raonzay *et al.* (1991) y Matsuoka *et al.* (1993) respecto a los efectos neurológicos observados a causa de la administración de L-BMAA por vía i.c.v. (intra-cerebro ventricular) durante un periodo de 10-60 días, los cuales eran muy patentes tras los primeros días de tratamiento, pero se iban atenuando hacia el final del periodo de tratamiento. Estos

resultados sugieren que el sistema nervioso central expuesto al L-BMAA desarrolla mecanismos de defensa ante un tratamiento muy prolongado, por lo que este aminoácido neurotóxico iría perdiendo potencia para provocar daño neurotóxico a lo largo del tratamiento. Por este motivo es necesario encontrar el equilibrio entre la dosis administrada y el periodo de tratamiento para conseguir un efecto acumulativo, sin llegar a causar la adaptación del organismo, y que se prolongue de forma crónica.

Por lo tanto, para llevar a cabo el presente estudio, seleccionamos la dosis de L-BMAA de 300 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, tratando a los animales al destete. Dado que las hembras presentaron un comportamiento más variable en la realización de las pruebas neurológicas, se decidió utilizar solamente machos para la observación de la evaluación neurológica a largo plazo.

La observación de la evaluación neurológica a largo plazo de los animales tratados con la dosis seleccionada de L-BMAA (figura 14), muestra que existen varias fases en la evolución de los síntomas: primero se da una fase de evolución rápida, durante los tres primeros meses postratamiento, posiblemente debidos a la excitotoxicidad provocada por el L-BMAA en el sistema nervioso central que concuerda con lo observado por otros autores (Ross *et al.*, 1987; Lobner *et al.*, 2007); posteriormente se da una segunda fase de estabilización en la que los síntomas evolucionan de forma más lenta, posiblemente debido a una liberación progresiva de los reservorios de L-BMAA en el cerebro, que es lo que propusieron Murch *et al.* (2004) como explicación a la aparición tardía de la ELA en humanos (alrededor de los 50 años).

5.4. Un día después de finalizar el tratamiento no existen cantidades detectables de L-BMAA en la sangre

En vista de que el daño causado por el L-BMAA se prolonga en el tiempo, se procedió a estudiar cómo varía la concentración de este aminoácido en sangre tras las inyecciones. El análisis por HR-MAS de los sueros obtenidos 24 h después de finalizar el tratamiento, demostró que no existen cantidades detectables de este aminoácido en su forma libre (no unido a proteínas) en la sangre de los animales tratados (figura 15). Este dato concuerda con los estudios de Duncan *et al.* (1991), que describieron que después de una sola dosis i.v. de L-BMAA (entre 50-400 mg/kg) en ratas adultas, este

aminoácido se aclara de la sangre en una fase de eliminación rápida, cayendo su concentración en plasma a menos del 5% media hora después de la inyección, concentrándose en tejidos periféricos como el hígado, el riñón y los músculos y, en menor medida, en el cerebro debido a la baja permeabilidad de la BHE. Adicionalmente, demostraron que la infusión de L-BMAA en el cerebro durante dos semanas consecutivas hace que la concentración de este aminoácido alcance concentraciones potencialmente tóxicas en este órgano.

Es de esperar que al haber utilizado inyecciones i.p. en nuestro estudio, el L-BMAA haya entrado en la circulación de una forma más progresiva que con las inyecciones i.v., lo que podría ralentizar el proceso inicial de aclaramiento en el plasma. Se ha demostrado que tanto el proceso de aclaramiento del plasma (Duncan *et al.*, 1991) como los niveles de acumulación en proteínas (Xie *et al.*, 2013; Karlsson *et al.*, 2014) son dependientes de la dosis. Además, al haber utilizado un tipo de administración subaguda, debemos pensar que la acumulación en los tejidos de L-BMAA ha sido mayor que la demostrada para la administración aguda, dado que la vida media del L-BMAA en sangre es de aproximadamente un día (Duncan *et al.*, 1991). Así, al realizar las inyecciones del aminoácido cada 24 h se favorecerá su acumulación.

5.5. El L-BMAA, a la dosis utilizada, produce daño oxidativo en hígado y riñón, pero no compromete la vida del animal

Una vez comprobados sus efectos neurotóxicos, nos interesó conocer si el L-BMAA podría causar daños en el organismo a través de otras vías. Al ser un xenobiótico, cuando el L-BMAA entra en el organismo es sometido a procesos metabólicos por parte del hígado y el riñón. En el proceso de detoxificación participan una o más enzimas del sistema antioxidante, por lo que podría producirse daño oxidativo. Además, el L-BMAA se convierte en metilamina en preparaciones de hígado y riñón de rata (Nunn y Ponnusamy, 2009), pudiendo tener los productos resultantes del metabolismo de la metilamina gran importancia en el aumento del estrés oxidativo y en las posibles alteraciones de la vasculatura cerebral a las que pueden dar lugar que, como ya se ha comentado anteriormente, han sido implicadas en la ELA (Abbott, 2008).

El hígado captura con cierta rapidez los xenobióticos de la sangre y contiene gran cantidad de enzimas y otros compuestos que metabolizan drogas, por lo que la biotransformación más importante tiene lugar en este órgano, tanto de forma cuantitativa como cualitativa (Guengerich, 1984). Por su parte, el riñón es el principal responsable de la excreción de los xenobióticos y de los productos de su transformación metabólica. Por lo tanto, hemos investigado el efecto del L-BMAA en estos órganos.

Se realizó un análisis del perfil hepático para valorar si este órgano resulta dañado por la administración de L-BMAA (tabla 6). El incremento de la actividad de la fosfatasa ácida (ACP) y la fosfatasa alcalina (ALP) así como de las transaminasas se encuentran dentro de los parámetros ampliamente conocidos de la adaptación del hígado a factores deletéreos (Satyalatha y Vardhani, 2005). En nuestro estudio, se ha detectado un incremento significativo del contenido proteico del hígado, un hecho relacionado probablemente con la inducción de enzimas detoxificantes (Valko *et al.*, 2007). Además, la actividad ACP también aumenta ligeramente. La actividad ACP se usa como un indicador de daño estructural en el tejido debido al incremento en la actividad lisosomal que conduce a degradación celular y necrosis (Teijón *et al.*, 2006). A pesar de este pequeño incremento de actividad, el resto de las actividades enzimáticas examinadas se mantienen en niveles fisiológicos, lo cual indica que la administración de L-BMAA no parece tener efectos dañinos sobre la función hepática.

La implicación del L-BMAA en el estrés oxidativo se ha demostrado en varios estudios (Lobner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009), y este puede ser uno de los mecanismos mediante el cual ejerce sus efectos deletéreos sobre el organismo. El estrés oxidativo se produce por la disrupción del balance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los sistemas antioxidantes del organismo. Las ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O^{2-}) y los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) se producen en las células como resultado de los procesos metabólicos (Vlahogianni *et al.*, 2007). Estos ROS pueden inducir daño celular por estimulación de la peroxidación lipídica (LPX) de las membranas celulares. Por lo tanto, las células necesitan sistemas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) y la supeóxido dismutasa (SOD), entre otros, para contrarrestar los efectos de las ROS (Sinha *et al.*, 2007). Así pues, un

balance entre moléculas pro-oxidantes/antioxidantes y el control sobre las ROS es crucial para mantener la homeostasis.

Este estudio examina, por primera vez, las secuelas producidas en el hígado y el riñón de ratas, mediante el análisis de parámetros de estrés oxidativo en ambos órganos. Hemos encontrado altos niveles de indicadores de estrés oxidativo en el hígado y, en menor medida, en el riñón.

El incremento del estrés oxidativo producido como resultado del tratamiento con L-BMAA está bien definido por el aumento de la producción de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) en el hígado y el riñón. El daño lipídico se observó en el hígado de rata, tanto en machos como en hembras, con un incremento de los niveles de MDA de un 31,7% y un 39,8% respectivamente, comparado con los niveles medidos en los animales control (figura 16A). Además, hemos detectado una tendencia hacia el incremento de MDA en los riñones de ratas hembra, mientras que este incremento es significativo sólo en machos (figura 16B). Es importante señalar que el daño oxidativo de los lípidos coincide con los síntomas motores en los animales afectados por el tratamiento con L-BMAA. Los datos obtenidos respecto a la oxidación lipídica en el hígado están de acuerdo con Miana-Mena *et al.* (2011), que también han descrito daño oxidativo lipídico en el hígado de ratones SODG93A, un modelo animal de ELA que también muestra desórdenes significativos en el sistema motor.

Normalmente, los efectos perjudiciales del estrés oxidativo se contrarrestan por los mecanismos de defensa naturales que implican enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa. En nuestro modelo, la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa están elevadas significativamente en los hígados de machos tratados (un 129,5% y un 29,1%, respectivamente) y, en menor medida, en los de las hembras (un 43,2% y un 8,5%, respectivamente) (figuras 17A y 18A). Se ha sugerido que la elevación de las defensas antioxidantes es una respuesta normal para incrementar los procesos de detoxificación en este órgano (Valko *et al.*, 2007). Este hecho junto con la disminución en la capacidad antioxidante total en el hígado y la elevada peroxidación lipídica, indican que el hígado sufre estrés oxidativo en respuesta a la acción del L-BMAA.

Por otra parte, el análisis llevado a cabo en el riñón demostró tanto en hembras como en machos que la actividad catalasa, pero no la glutatión peroxidasa, estaba aumentada. Este hecho junto con el incremento en los antioxidantes totales y un incremento menor en la concentración de MDA en los animales tratados, pueden indicar que el riñón sufre un grado menor de estrés oxidativo que el hígado. Una posible explicación para este hecho es que, como sucede con otros xenobióticos (Henke, 2009), sus intermediarios metabólicos pueden tener una toxicidad mayor que el compuesto en su forma nativa, siendo el hígado el único órgano expuesto a estas formas transicionales.

El glutatión juega un papel principal en el mantenimiento del estado redox y actúa como antioxidante detoxificando gran número de metales, drogas y xenobióticos (Meister y Anderson, 1983). En el hígado de ratas macho y hembra tratadas con L-BMAA, los niveles de GSH eran más del doble que en los animales control (figura 19A). Además, los niveles de GSSG también estaban incrementados en los animales tratados. Cuando se exponen las células a un importante estrés oxidativo, se acumula GSSG y el cociente GSH/GSSG disminuye. Por lo tanto, ambos parámetros son indicadores útiles del estrés oxidativo en células y tejidos. La parte más interesante de estos resultados encontrados en hígado ponen de manifiesto que los valores incrementados de GSSG causaron una considerable caída en el cociente GSH/GSSG. Dicha caída fue del 60% para las hembras tratadas y de un 76% para los machos en comparación con sus respectivos controles. Estos resultados señalan el marcado estrés oxidativo que ocurre en este órgano por los efectos del L-BMAA.

La disminución de la relación GSH/GSSG, junto con la depleción de los antioxidantes totales, el aumento de la peroxidación lipídica y la disminución de la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, son indicadores del fuerte estrés oxidativo presente en el hígado de animales tratados con L-BMAA, que es compensado, al menos parcialmente, por el efecto protector del aumento de los niveles de GSH.

Los análisis realizados en riñón indican que el tratamiento con L-BMAA produce un incremento de GSH de sólo el 14% (figura 19B). Este bajo incremento de glutatión puede deberse a los altos niveles de antioxidantes totales (un 70% sobre los animales

control) y una menor peroxidación lipídica. Se ha descrito que en el caso de la administración subaguda de xenobióticos que producen estrés oxidativo (Maiti y Chatterjee, 2000), el hígado parece estar más protegido que el riñón por un incremento de compuestos antioxidantes, como el glutatión. Aun así, son necesarios más estudios que confirmen el posible efecto protector del glutatión en la acción del L-BMAA sobre el sistema de defensas antioxidantes del hígado y del riñón.

Estos ensayos han demostrado que la administración de L-BMAA produce daño oxidativo en el hígado y el riñón, sobre todo por el aumento de la peroxidación lipídica y la elevada actividad catalasa. Por otra parte, el hígado parece ser más susceptible a la acción toxica del L-BMAA que el riñón, posiblemente debido al proceso de detoxificación. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el daño oxidativo causado no compromete la vida del animal dado que ambos órganos siguen siendo funcionales. Este hecho avala la utilización de este modelo animal para profundizar en el conocimiento sobre los efectos neuropatológicos que provoca este agente neurotóxico.

El daño en el hígado y los riñones y la evolución de la afectación neurológica a largo plazo, nos llevan a pensar que este neurotóxico se bioacumula y que se produce una liberación lenta con el metabolismo proteico. Se ha demostrado que el L-BMAA se incorpora de forma errónea a las proteínas en lugar de la L-serina y permanece en el organismo formando parte de un reservorio proteico que puede liberarse de forma prolongada en el tiempo (Murch *et al.*, 2004; Karlsson *et al.*, 2009; Dunlop *et al.*, 2013). Además, Karlsson *et al.* (2014) demostraron que el L-BMAA se encuentra incorporado a las proteínas del hígado 24 h después de tratar a ratas neonatas (días posnatales 9-10), en una alta proporción dosis dependiente. Sin embargo, estos autores no encontraron L-BMAA libre o unido a proteínas en este mismo órgano 7 meses después del tratamiento (Karlsson *et al.*, 2014). Aun así, la presencia de L-BMAA ha sido descrita en muestras *post mortem* de enfermos de ELA y otras enfermedades neurodegenerativas (revisado en la introducción), por lo que es posible que una exposición más prolongada al L-BMAA, como la que llevamos a cabo en este estudio, de lugar a una mayor acumulación en órganos como el hígado, prolongando así el daño mucho tiempo después de que se produjera la exposición.

5.6. Las ratas tratadas con L-BMAA presentan alteraciones semejantes a las descritas en la ELA

5.6.1. Los animales presentan alteraciones en la coordinación motora

Una vez comprobados los efectos neurológicos causados por la administración de L-BMAA, se llevaron a cabo una serie de pruebas de funcionalidad y control motor. Como señalan Aoki *et al.* (2011), las pruebas funcionales seleccionadas para testar las capacidades motoras de los animales en nuestro estudio, fueron realizadas con el RotaRod y el test de huellas. Los dos test realizados con el RotaRod, el test de velocidad máxima y el test de tiempo de permanencia a velocidad constante, sirven para medir los movimientos coordinados de las extremidades delanteras y las traseras, mientras que el test de huellas (o *landing foot-splay*) sirve para medir la función refleja.

Los resultados obtenidos con el test del RotaRod a 15 rpm sugieren que los animales tratados con L-BMAA, tanto hembras como machos, presentan alteraciones en la coordinación motora (figura 21). Pero la evolución del tiempo de permanencia sobre el RotaRod es distinta dependiendo del sexo. En el caso de las hembras, tratadas y controles, van aumentando el tiempo de permanencia, aunque la diferencia entre estos dos grupos se mantiene a lo largo de todo el periodo de estudio. Sin embargo, los machos tratados mantienen el mismo tiempo de permanencia a lo largo de todo el estudio, lo que podría indicar que el daño neurológico que afecta a la coordinación motora se ha producido en los primeros momentos del tratamiento con L-BMAA. Es importante señalar que los machos control van disminuyendo el tiempo de permanencia progresivamente. Dado el gran incremento de peso que experimentan los machos de rata en este periodo, mucho mayor que el de las hembras, los experimentadores observaron que no encontraban dificultad en abandonar el aparato una vez comenzada la prueba. Esto nos lleva a pensar que la prueba debe ser modificada para los machos adultos.

La disminución del tiempo de permanencia de los animales tratados respecto a los controles, están en concordancia con los obtenidos en los estados iniciales de la enfermedad en el modelo transgénico SOD1 de ELA familiar en ratón (Naor *et al.*, 2009), que va disminuyendo el tiempo de permanencia según avanza la enfermedad.

Respecto al test de huellas, se observa una tendencia, tanto en el caso de las hembras como de los machos, a disminuir la distancia entre las patas en el aterrizaje, lo que supone un fallo en el reflejo del aterrizaje que se produce para amortiguar el golpe (figura 22).

Los resultados de estas pruebas motoras, así como los efectos neurológicos descritos apoyan los resultados obtenidos en diversos estudios de intoxicación, en diferentes especies, con L-BMAA *in vivo* (Vega *et al.*, 1968; Polsky *et al.*, 1972; Spencer *et al.*, 1987 a, b; Seawright *et al.*, 1990; Smith y Meldrum, 1990; Rakonczay *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993; Matsuoka *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2009, 2010), en los que los autores describen una gran variedad de alteraciones motoras como ataxia, dificultad en la deambulación y fallos en el control motor.

5.6.2. Los análisis morfométricos por IRM indican alteraciones tanto en el músculo de las patas traseras de las ratas como en corteza cerebral y ventrículos

Como señalan Alvarez-Uria Tejero *et al.* (2011), la ELA se caracteriza por la degeneración de las neuronas de la corteza cerebral, de los núcleos motores del tronco encefálico y del asta anterior de la médula espinal. Dicha degeneración condiciona los síntomas clínicos de los pacientes, pudiendo presentar signos de parestesia espástica e hiperreflexia, propios de las motoneuronas corticales, disfagia y disartria, propios de la parálisis bulbar, o debilidad, fasciculaciones y atrofia muscular progresiva, típicos de la lesión de las motoneuronas espinales o bien una combinación de todas ellas (Berciano *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003; Provenzale, 2004).

Así pues, una de las principales características de la ELA es la debilidad muscular y las fasciculaciones. Principalmente en los pacientes que padecen el debut espinal de la enfermedad, se ha observado atrofia muscular focal en exámenes tempranos, tanto en

las extremidades superiores, especialmente en las manos, los antebrazos y los hombros, como en las extremidades inferiores, sobre todo proximalmente en los muslos o distalmente en los pies (Wijesekera y Leigh, 2009). Estas características clínicas son indicativas de la pérdida de neuronas en todos los niveles del sistema motor, desde la corteza al asta anterior de la médula espinal (Mitchell y Borasio, 2007). Los signos clínicos de este desorden incluyen por lo tanto los hallazgos en las motoneuronas superiores y las inferiores.

La medida del volumen muscular de las extremidades traseras en nuestro estudio, ha revelado que los animales tratados con L-BMAA presentan una disminución progresiva del volumen muscular en las extremidades traseras que, además, parece afectar primero a una de las extremidades, aunque finalmente afecta a ambas (figuras 23 y 24). Esta pérdida de volumen podría implicar atrofia muscular. Aunque nuestros animales no perdieron la capacidad locomotriz en el periodo estudiado, la disminución del volumen muscular detectado es indicativo de una pérdida de inervación desde las motoneuronas de la médula espinal.

Gurney *et al.* (1994 a, b), describieron en su modelo de ratón transgénico SOD1, la degeneración de motoneuronas espinales y una severa pérdida de axones mielinizados en los nervios intramusculares, que se veía en parte compensada por la reinervación llevada a cabo por los axones restantes. En este modelo se descubrió que tan sólo dos axones del nervio glúteo inferior eran suficientes para inervar más del 90% de las miofibrillas del músculo del glúteo, lo que sugiere que los mecanismos de reinervación compensan la severa pérdida de motoneuronas hasta una etapa tardía en el curso de la enfermedad.

Tal y como sucede en los pacientes de ELA y en el modelo genético SOD1 en roedores, es posible que en nuestro modelo la pérdida total de la movilidad de las patas traseras no se produzca hasta que haya una pérdida casi completa de neuronas motoras en la médula espinal, que se vería en un estado más avanzado de la enfermedad. Este estado de pérdida completa de la movilidad y el control motor, correspondiente con un nivel 10 en nuestra escala de evaluación, que hasta el momento sólo ha sido observado en los animales tratados con la dosis más alta ensayada, 600 mg/kg/día,

debido a la alta toxicidad del L-BMAA durante el tratamiento. Estos animales mostraron incapacidad para usar las extremidades y temblor generalizado. Posiblemente, en los animales tratados con dosis más bajas este estado no se alcance hasta edades más tardías o un tiempo postratamiento superior al estudiado hasta el momento.

Además, la pérdida del control motor detectado en las pruebas funcionales puede deberse a alteraciones en varios puntos de la vía motora. Para comprobar estas alteraciones se utilizó la imagen de resonancia magnética (IRM), que es una técnica de imagen 3D que ha sido usada en estudios morfométricos para la cuantificación del volumen de la materia gris y la materia blanca en el sistema nervioso central (Ashburner y Fristone, 2000; Kollewe *et al.*, 2012).

En este estudio hemos observado una disminución del volumen de la corteza motora (áreas M1 y M2) de más de un 10% en la corteza motora derecha y de casi un 19% en el caso de la corteza motora izquierda, en los animales tratados con L-BMAA respecto a los animales control (figura 26). En cambio, no se observaron diferencias en el volumen total de la corteza cerebral, lo cual indica un daño muy focalizado sobre regiones concretas de la corteza implicadas en el control del movimiento. Además, también hemos encontrado un aumento del volumen de los ventrículos laterales en los animales tratados, de casi un 60% en el ventrículo lateral derecho y de más de un 27% en el ventrículo lateral izquierdo (figuras 27 y 28).

En varios estudios volumétricos se ha descrito la atrofia de la corteza motora primaria en pacientes (Kollewe *et al.*, 2012), aunque es sorprendente que no se haya consenso en todos los trabajos publicados hasta el momento (Agosta *et al.*, 2007; Mezzapesa *et al.*, 2007; Grosskreutz *et al.*, 2009; Filippini *et al.*, 2010). Además, en estudios con pacientes de ELA con disfunción cognitiva, se ha encontrado una amplia disminución del volumen de la materia blanca frontotemporal (Abrahams *et al.*, 2005), así como un agrandamiento ventricular y atrofia parenquimal (Frank *et al.*, 1997). Recientemente, Mezzapesa *et al.* (2013) han confirmado la reducción del volumen de la corteza motora primaria en pacientes de ELA respecto a controles sanos, mientras que Cosottini *et al.* (2013) describieron la atrofia de la sustancia gris en áreas motoras y extra-motoras de

la corteza. Dicha pérdida de volumen puede explicarse gracias a los estudios de Nishihira *et al.* (2008), en los que se describen una severa pérdida neuronal, evidente en los sistemas de motoneuronas superiores e inferiores, tras el análisis *post mortem* de muestras de pacientes de ELA esporádica.

Otros trabajos combinan los estudios morfométricos con estudios de difusión (*diffusion tensor imaging* - DTI), para comprobar las alteraciones en los tractos de materia blanca. Gracias a esta técnica se ha comprobado en pacientes con ELA que existen alteraciones que involucran al tracto corticoespinal rostral y al cuerpo calloso, asumiendo que reflejan una pérdida de mielina secundaria (de tipo Walleriana) (Prell *et al.*, 2013; Filippini *et al.*, 2010). Recientemente, se ha constatado en pacientes con ELA el adelgazamiento de la corteza motora primaria y la alteración de las fibras del cuerpo calloso y la parte rostral del tracto corticoespinal que se correlaciona con el progreso de la enfermedad (Verstraete *et al.*, 2010). Lillo *et al.* (2012), demostraron que los cambios en pacientes de ELA se restringían principalmente a la corteza motora y al cíngulo anterior así como a los tractos de materia blanca subyacentes.

Es importante señalar que, en estudios *post mortem* en pacientes una importante desmielinización en el cerebro y en el tracto piramidal espinal (Kolind *et al.*, 2013). Kolind *et al.* (2013), investigaron estos procesos degenerativos mediante una nueva secuencia de IRM (mcDESPOT) sensible a los *pools* de agua dentro de la mielina y en los espacios intra y extracelulares. De esta forma, demostraron que los pacientes de ELA muestran un incremento del agua intra y extracelular, un signo indicativo de actividad neuroinflamatoria.

La neuroinflamación se ha establecido como un factor importante en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA. En varios momentos a lo largo del curso de la enfermedad, los astrocitos y la microglia aparecen marcadamente activados, produciendo tanto moléculas neuroprotectoras como pro-inflamatorias, que pueden disminuir o incrementar la tasa de degeneración de motoneuronas primarias respectivamente (Evans *et al.*, 2013). Existe una importante activación o proliferación de la microglía y los astrocitos en estadios específicos de la enfermedad en modelos de ELA en ratón (Hall *et al.*, 1998; Weydt *et al.*, 2002) que también se han

observado en humanos *in vivo* (Turner *et al.*, 2004) y en exámenes *post mortem* (Anneser *et al.*, 2004). Andjus *et al.* (2009), encontraron una patente dilatación de los ventrículos laterales en un modelo genético de ELA en rata, que relacionaron con procesos neuroinflamatorios, posiblemente facilitados por la presencia de una BHE comprometida.

Aunque en nuestro estudio no se ha comprobado la activación del sistema inmune, los signos de neurodegeneración, es decir, la disminución del volumen de la corteza motora y, sobretudo, el sorprendente aumento del volumen ventricular que supone un notable aumento del agua extracelular, nos llevan a pensar que se hayan activado este tipo de procesos neuroinflamatorios.

5.6.3. Los análisis de hiperintensidad por IRM indican alteraciones en núcleos bulbares implicados en la deglución

El diagnóstico de rutina mediante los exámenes por IRM en humanos, se dirigen principalmente a la detección de la degeneración neuronal, que se visualiza como hiperintensidades en las imágenes de resonancia magnética (Andjus *et al.*, 2009). Aunque cuando los déficits motores predominan normalmente en las extremidades, la innervación bulbar también puede verse severamente afectada, conduciendo a la atrofia de la lengua, disfagia y disartria (Guegan y Przedborski, 2005). Existen evidencias de una vulnerabilidad diferencial entre las motoneuronas, estando ciertos núcleos motores de los nervios craneales típicamente afectados en la ELA, como el del trigémino, el facial, el ambiguo y del hipogloso (Reiner *et al.*, 1995).

Los animales de nuestro modelo experimental, tal y como se ha indicado en el apartado 4 de Resultados, presentan un patente incremento en la intensidad del núcleo motor del trigémino y del núcleo del tracto solitario. El núcleo del tracto solitario es un centro de relevo de la información aferente visceral. Entre otras funciones recibe el estímulo sensitivo directo de las papilas gustativas y es un importante centro de control del sistema nervioso autónomo. Además, recibe estímulos sensitivos viscerales del nervio vago, por lo que este núcleo representa un centro clave de integración en el control de la alimentación y el metabolismo. Por otro lado, el núcleo motor del trigémino se

encarga de la inervación eferente de los músculos de la masticación, el milohioideo y del músculo tensor del paladar que participan en el proceso de la masticación y de la deglución. Ambos núcleos están implicados en el control nervioso de la deglución y del vómito.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en estudios realizados en modelos genéticos de ELA. Andjus *et al.* (2009) y Bataveljić *et al.* (2009) describieron en ratas transgénicas hSOD-1G93A focos de neurodegeneración en el tronco encefálico, en las áreas correspondientes a los núcleos motores del trigémino y del vago, el tracto trigeminal espinal y el núcleo ambiguo entre otros. Estos hallazgos también se han observado en el modelo murino mutante de ELA (Angenstein *et al.*, 2004; Zang *et al.*, 2004; Niessen *et al.*, 2006; Bucher *et al.*, 2007). Además, se han encontrado hiperintensidades por IRM en regiones similares del tronco encefálico de pacientes con ELA (Basak *et al.*, 2002; Hecht *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003), que concuerdan con el descenso de NAA (y los distintos ratios asociados) en la ELA como marcador de neurodegeneración en el tronco encefálico (Kalra y Arnold, 2009).

Todos estos estudios, tanto en modelos animales como en los propios pacientes de ELA resaltan la importancia del daño en los núcleos bulbares en la sintomatología de la enfermedad.

Por lo tanto, podemos concluir que la administración *in vivo* de L-BMAA provoca daños en núcleos bulbares implicados con el control de la deglución, una de las principales alteraciones observadas en los pacientes de ELA, sobre todo en los pacientes que presentan el debut bulbar de la enfermedad. Estos hechos nos llevan a pensar que los daños causados por el L-BMAA no sólo implican alteraciones en el control motor, sino que también implican alteraciones en otras vías nerviosas muy relacionadas con la sintomatología de la ELA.

5.6.4. El análisis de metabolitos por HR-MAS muestra la presencia de procesos neurodegenerativos

Gracias a los ensayos de HR-MAS hemos encontrado más signos indicativos de la existencia de procesos neurodegenerativos, mediante la cuantificación de los niveles de NAA, Cr y Cho. El NAA se localiza principalmente en las neuronas, por lo que su concentración en el cerebro está relacionada directamente con la densidad neuronal, el metabolismo y el estatus funcional. La medida de Cr, que consiste en creatina y fosfocreatina, es un indicador del estatus energético celular. La Cho deriva de los componentes de la membrana celular glicerofosfocolina, fosfocolina y colina libre, y provee información sobre la integridad estructural de las membranas celulares, su síntesis y su degradación. Las alteraciones en estos metabolitos se han propuesto como marcadores fiables de la evolución de enfermedad en el diagnóstico de la ELA en humanos (Rooney *et al.*, 1998; Álvarez-Uría Tejero *et al.*, 2011). Como señala Martin (2007), frecuentemente las medidas de NAA se basan en el ratio NAA/Cr, ya que la creatina y la fosfocreatina están en equilibrio químico, y es de esperar que la concentración regional total de ambos compuestos no esté afectada por los procesos neurodegenerativos.

En los animales tratados con L-BMAA, los ratios NAA/Cho y NAA/Cho+Cr tienden a disminuir tanto en la corteza motora como en la médula espinal lumbar (figura 30), mientras que el ratio NAA/Cr sólo disminuye significativamente en este último tejido. Los índices anormales de NAA se han relacionado con parámetros clínicos como la fuerza y la severidad de algunos signos de las motoneuronas superiores (Kalra y Arnold, 2009). Como señalan Álvarez-Uría Tejero *et al.* (2011), en la valoración de la afectación de la motoneurona primaria es de mayor utilidad el estudio de los cocientes de metabolitos que la cuantificación de los mismos individualmente, siendo característico el descenso de los cocientes NAA/Cho, NAA/Cr y NAA/Cho+Cr en la corteza motora. La mayoría de los estudios se centran en áreas determinadas de la corteza cerebral o en un seguimiento longitudinal del tracto corticoespinal en pacientes. A través de estos trabajos, diversos autores han correlacionado la disminución de los citados ratios en la corteza motora, sobre todo NAA/Cr y NAA/Cho,

con la progresión de la enfermedad (Pohl *et al.*, 2001; Mitsumoto *et al.*, 2007; Kaufmann *et al.*, 2007; Pyra *et al.*, 2010).

Los estudios de Carew *et al.* (2011 a, b) e Ikeda *et al.* (2013) sobre la medula espinal cervical de pacientes revelaron una disminución significativa de los cocientes NAA/Cr (de entre un 25-40%) que se correlacionaban con la severidad de los síntomas. Además, la disminución de este ratio se correlacionó con denervación y cambios neurogénicos crónicos en los músculos paraespinales a nivel C2 y en las extremidades superiores (Ikeda *et al.*, 2013). Nuestros resultados revelan que la alteración de este ratio a nivel lumbar en los animales tratados con L-BMAA, lo que afectaría a la inervación de las extremidades inferiores en lugar de las superiores, como se indica en los trabajos de estos autores.

Por lo tanto, en nuestro modelo la disminución de los cocientes NAA/Cho, NAA/Cr y NAA/Cr+Cho, indican la disfunción o la pérdida neuronal que causaría una bajada de los niveles de NAA tanto en la corteza motora como en la médula espinal lumbar, aunque la disminución significativa del ratio NAA/Cr en este último tejido podría indicar un grado mayor de afectación. Estos resultados, junto con la disminución del volumen de la corteza motora y del volumen muscular de las extremidades traseras, nos llevan a pensar que los animales tratados con L-BMAA presentan señales de neurodegeneración similares a las presentes en los pacientes de ELA.

Por otra parte, se sabe que el daño neuronal aparece conjuntamente con un aumento de la actividad glial, reflejada en un incremento del espectro del mioinositol (mIns) (Kalra y Arnold, 2006; Kalra *et al.*, 2006). Aun así, no hemos encontrado ninguna variación en el espectro del mIns, ni en la médula espinal lumbar ni en la corteza motora (no se muestran los datos), lo que indica que en el momento en el que se realizó este análisis los procesos gliales no estaban activos.

5.6.5. El análisis ultraestructural en corteza motora y médula espinal lumbar afecta a las motoneuronas causando estrés en el R.E., disfunción de la vía secretora, alteraciones mitocondriales, incremento de la autofagia y presencia de abundantes oligodendrocitos con núcleos típicamente apoptóticos

Para confirmar la existencia de procesos deletéreos en las motoneuronas, se llevaron a cabo una serie de ensayos con muestras de corteza motora y médula espinal lumbar. El primer paso fue el análisis ultraestructural para confirmar la afectación de las neuronas de la corteza motora y las motoneuronas de la médula espinal lumbar por el tratamiento *in vivo* con L-BMAA. Nuestros resultados muestran una abundante fragmentación del retículo endoplásmico y numerosos polirribosomas libres (figuras 31 y 32), lo que está en concordancia con el estrés sufrido por este orgánulo, descrito en la ELA, debido a la acumulación de proteínas mal plegadas (Matus *et al.*, 2013; Igaz *et al.*, 2011).

El estrés de retículo endoplásmico y, en general, la disfunción de toda la vía secretora, juega un papel central en la patogénesis de la ELA. La alteración de los sistemas de síntesis y degradación de proteínas, que han sido ampliamente estudiados en la ELA (Okamoto *et al.*, 2010; Walker y Atkin, 2011), conducen a la acumulación de proteínas mal-plegadas desencadenando la respuesta a proteínas mal-plegadas (UPR) y, si no se restaura la homeostasis celular, finalmente da lugar a la activación de procesos apoptóticos. Por lo tanto, los mecanismos de plegamiento incorrecto de proteínas están cobrando un creciente interés en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la agregación proteica, como la ELA. Como se ha comentado anteriormente, Dunlop *et al.* (2013) investigaron el posible papel del L-BMAA en estos mecanismos, dados los indicios encontrados por otros autores (Karlsson *et al.*, 2009 a), demostrando que el L-BMAA se incorpora a proteínas siendo esta incorporación inhibida por L-serina. Estos resultados sugieren que el L-BMAA se incorpora erróneamente en lugar de la L-serina en las proteínas tras la exposición a este aminoácido neurotóxico. Estos hallazgos dan pie a pensar que en nuestro caso, los daños detectados en los orgánulos de la vía secretora se deben a la acumulación de proteínas mal plegadas, debido a la incorporación errónea de L-BMAA.

Mediante estudios *post mortem* en humanos se ha demostrado la implicación del estrés de retículo endoplásmico con la ELA esporádica. Así se han identificado la regulación al alza y la activación de la UPR, además de la descripción de niveles elevados de chaperonas del RE y señales de muerte ligadas al estrés de RE (Ilieva *et al.*, 2007; Hetz *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2009; Vijayalakshmi *et al.*, 2011).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Oyanagi *et al.* (2008) y Sasaki (2010) que detectaron en células afectadas del asta anterior de la médula espinal de pacientes de ELA un RE con cisternas distendidas y fragmentadas. Adicionalmente, el análisis de motoneuronas aparentemente normales en estas áreas, revelaron que el lumen del RE estaba dilatado y contenía material amorfo o granular (Sasaki, 2010). Finalmente, el desprendimiento de los ribosomas del RE rugoso fue relacionado con la distensión presentada por este orgánulo.

Recientemente, se ha sugerido que el desensamblaje del retículo endoplásmico también puede ocurrir en casos de ELA asociados con TDP-43 alterado (Walker y Atkin, 2011). Además, Okle *et al.* (2012) observaron que las células SH-S5Y tratadas con concentraciones bajas de L-BMAA mostraban una desregulación de la homeostasis proteica celular con el consiguiente estrés de retículo endoplásmico que es independiente de los efectos a grandes concentraciones como la excitotoxicidad y el estrés oxidativo.

En los animales tratados con L-BMAA, hemos encontrado daños en otros orgánulos además de los implicados en la vía secretora, como las mitocondrias. Las mitocondrias juegan un papel complejo en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas debido a su implicación en un gran número de procesos, incluyendo la regulación de la excitotoxicidad, la homeostasis del calcio intracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno y los procesos apoptóticos (Lezi y Swerdlow, 2012). Nuestros resultados muestran mitocondrias hinchadas, vacuolizadas y dañadas en las motoneuronas de la corteza motora y de la médula espinal de animales tratados con L-BMAA. Estos resultados concuerdan con los datos encontrados en estudios relacionados con la patología de la ELA (Costa *et al.*, 2010; Martin, 2010). Varios estudios por microscopía electrónica han mostrado anomalías en la morfología

mitocondrial en el músculo esquelético, el hígado, las motoneuronas espinales y las motoneuronas corticales de pacientes con ELA (Sasaki e Iwata, 1999; Menzies *et al.*, 2002). Xu *et al.* (2004) descubrieron la presencia de una vacuolización masiva de las mitocondrias cuando debuta la enfermedad en ratones transgénicos SOD1. Por otro lado, Sasaki e Iwata (2007) encontraron en muestras de médula espinal anterior de pacientes con ELA diversas alteraciones mitocondriales, entre las que destacan las mitocondrias hinchadas en el soma neuronal. Estos autores sugieren que dichos hallazgos reflejan la alteración del metabolismo mitocondrial, probablemente asociado con el mecanismo patológico del proceso degenerativo de la ELA esporádica.

La disfunción mitocondrial puede desencadenar o propagar la neurodegeneración y por ello puede ser de una importancia crítica para el desarrollo de la ELA. Además, se sabe que la sobrecarga de Ca^{2+} en las neuronas provoca muerte celular. La activación de los receptores de glutamato por parte del L-BMAA incrementa la concentración de Ca^{2+} citosólico, por lo tanto, las mitocondria acumula calcio con avidez resultando en el hinchamiento osmótico y la ruptura de la membrana mitocondrial externa (Chiu *et al.*, 2011). Además, el exceso de activación de los receptores de glutamato puede provocar un incremento de la producción de ROS en la mitocondria, el fallo bioenergético y anomalías en el tráfico mitocondrial (Chang y Reynolds, 2006).

Tanto la desestabilización del retículo endoplásmico como el daño mitocondrial desencadenan la activación de procesos autofágicos, que en principio pueden ser un mecanismo de defensa para restaurar la homeostasis celular, pero que también han sido implicados en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Walker y Atkin, 2011). La mitocondria y su dinamismo físico juegan un papel vital en varios estados de la autofagia, desde la biogénesis inicial del autofagosoma y la regulación de la autofagia a través de la beclina-1, hasta la muerte celular mediada por autofagia (Rubinsztein *et al.*, 2012). Además, la disfunción mitocondrial se ha propuesto como el punto de convergencia para múltiples vías que causan la activación de la apoptosis y la pérdida neuronal en la ELA (Reyes *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010). El gran número de autofagosomas y fagolisosomas encontrados en las motoneuronas espinales de animales tratados, y en menor medida en la corteza motora, indican que se ha producido la activación de este tipo de procesos autofágicos a causa del tratamiento

con L-BMAA. Este incremento de autofagosomas en las motoneuronas de la médula espinal ha sido igualmente observado por varios autores en pacientes de ELA esporádica y familiar (Li, *et al.*, 2008; Morimoto *et al.*, 2007; Sasaki, 2011).

Publicaciones recientes sugieren que la muerte neuronal progresiva en la ELA puede implicar células no neuronales, como las células gliales y el músculo esquelético (Yoo y Ko, 2011). Por otra parte, Sica *et al.* (2011) sugirieron que estos astrocitos pueden ser la diana primaria portando un agente todavía desconocido en la etiología y la patogénesis de la ELA. Los oligodendrocitos apoptóticos pueden reflejar que la glía también está afectada, un tema que también ha sido estudiado en otros trabajos que relacionan esta disfunción con alteraciones neuronales en las enfermedades neurodegenerativas (King *et al.*, 2011). Además, otros autores han encontrado degeneración de la mielina en secciones lumbares y sacras de la médula espinal de ratas SOD1 (Niebroj-Dobosz *et al.*, 2007). En nuestros experimentos hemos detectado abundante oligodendrocitos con núcleos típicamente apoptóticos en la médula espinal lumbar de ratas tratadas con L-BMAA, lo que nos lleva a pensar que las células gliales también se ven afectadas por las acciones de este aminoácido. Recientemente, Philips *et al.* (2013) describieron cambios degenerativos en los oligodendrocitos del asta ventral de la médula espinal, abundantemente presentes tanto en pacientes de ELA esporádica como en el modelo de ratón transgénico SOD1G93A. En el caso del ratón SOD1G93A, estos cambios se correlacionan con el debut y la progresión de la enfermedad, lo que sugiere que la patología de los oligodendrocitos está implicada en el proceso de la ELA en el modelo genético y en los pacientes. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que en las ratas tratadas con L-BMAA presentan una patología similar a la descrita en los pacientes de ELA pero, aun así, son necesarios más estudios para profundizar en este punto.

Dados los numerosos indicios que hemos obtenido sobre la activación de procesos autofágicos mediante microscopía electrónica, el siguiente paso en nuestro estudio fue constatar dicha activación en el tejido nervioso de los animales tratados con L-BMAA.

Cuando se inicia la formación de los fagosomas, la proteína LC3-I sufre una serie de modificaciones para formar LC3-II, una proteína indispensable para la extensión de la

membrana de los autofagosomas. Por este motivo, LC3-II se usa como marcador estándar de los niveles de autofagia en los tejidos (Nassif *et al.*, 2010). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con L-BMAA provoca un aumento de los niveles de LC3 tanto en la corteza motora como en la médula espinal lumbar, aunque el incremento es mucho más marcado en este último tejido (figura 34). En las imágenes obtenidas por microscopía confocal, el marcaje de LC3 aparece como grandes acúmulos en el citoplasma celular, posiblemente debido a que es una proteína asociada a la membrana de los autofagosomas (figura 36). Por lo tanto, el L-BMAA ha producido procesos autofágicos que son compatibles con las observaciones realizadas hasta el momento en estos animales, es decir, la presencia de fagosomas en distintos estadios y de mitocondrias dañadas.

Además, en ambos tejidos se obtuvo un incremento significativo de mTOR fosforilado en los animales tratados con L-BMAA (figura 35). En su estado activo, mTOR es un represor de la autofagia, pero ante la presencia de señales apoptóticas se des-reprime la kinasa de mTOR que lo inactiva por fosforilación (Nassif *et al.*, 2010). De esta forma se produce la activación de la vía autofágica dependiente de mTOR. Por lo tanto, mTOR fosforilado se utiliza como marcador para saber si la vía autofágica es dependiente o independiente de mTOR. Nuestros resultados muestran que el tratamiento *in vivo* con L-BMAA provoca la activación de la vía apoptótica dependiente de mTOR tanto en corteza motora como en médula espinal lumbar. Es importante señalar que en la médula espinal lumbar la diferencia entre controles y tratados respecto a los niveles de P-mTOR era menor que en el caso de la corteza, mientras que los niveles de LC3 eran muy superiores. Esto podría indicar que en el caso de la médula se estén activando otras vías apoptóticas en los animales tratados, aunque es necesario profundizar más en este punto para poder confirmarlo.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Hertz *et al.* (2009) en muestras de médula espinal de pacientes de ELA esporádica y de ELA familiar, en las que observaron una marcada inducción de LC3-II y de beclina-1. En este caso no se investigó la posible activación de la vía dependiente de mTOR, pero estos resultados nos sugieren que en el caso de los animales tratados con L-BMAA se pueden estar activando otras vías apoptóticas. Además, estos autores encontraron una importante

correlación entre la regulación al alza de la beclina-1 con la acumulación de proteínas ubiquitinadas y la regulación al alza de chaperonas del RE en este tejido, proporcionando así una conexión entre el estrés de RE y la activación de la autofagia en pacientes de ELA (Hertz *et al.*, 2009).

Cuando se agregan proteínas anormales o mal plegadas en inclusiones citoplasmicas, nucleares o extracelulares, éstas causan daño a los orgánulos y disfunción sináptica en el sistema nervioso (Walker y LeVine, 2000). Para mantener la homeostasis celular se ponen en marcha los sistemas de eliminación de componentes celulares dañados: el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) que degrada las proteínas de vida corta en citoplasma y el núcleo, y la vía autofagia-lisosoma que digiere las proteína de vida larga y los orgánulos anormales en el citoplasma (Nijholt *et al.*, 2011). Las neuronas, debido a su extrema polarización, su tamaño y su naturaleza posmitótica, son particularmente sensibles a la acumulación de agregados o compuestos citosólicos dañados, por lo que dependen de la autofagia para su supervivencia (Tooze y Schiavo, 2008). Por lo tanto, en los últimos tiempos se ha enfatizado la importancia de la apoptosis en las enfermedades caracterizadas por proteinopatías (Agostini *et al.*, 2011; Hellwig *et al.*, 2011), como la ELA.

Gracias a las investigaciones en este sentido, se ha establecido que los elevados niveles de agregados proteicos pueden causar la disfunción del UPR (Crippa *et al.*, 2010), y la subsecuente activación compensatoria de la autofagia (Korolchuk *et al.*, 2010). Además, se ha visto tanto la disfunción de la UPR (Cheroni *et al.*, 2005) como la inducción de la autofagia en muestras *post mortem* de casos de ELA (Sasaki, 2011; Hertz *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en nuestro modelo de ELA esporádica mediante el tratamiento con L-BMAA, hasta el momento, muestran que efectivamente se están reproduciendo varias de las características patológicas detectadas en pacientes con ELA, como el daño a orgánulos como el RE y las mitocondrias, y la subsiguiente activación de los procesos autofágicos.

Por otro lado, resulta sorprendente el marcaje observado en las imágenes obtenidas por microscopía confocal respecto al antígeno neuronal nuclear (NeuN). NeuN es una

proteína específica expresada en las neuronas posmitóticas (Lavezzi *et al.*, 2013), por lo que se usa habitualmente para diferenciar las neuronas del resto de células en el tejido nervioso. El anticuerpo utilizado en este trabajo marca principalmente el núcleo neuronal, pero el citoplasma y las dendritas también son inmunorreactivas, aunque en menor medida. De hecho, NeuN es un factor de transcripción que se expresa en el núcleo y el citoplasma de las neuronas en el estado posmitótico, cuando empiezan a diferenciarse en células maduras funcional y morfológicamente (Lavezzi *et al.*, 2013). Diversos trabajos han descrito la pérdida de señalización por NeuN bajo varias situaciones patológicas, como isquemia cerebral, hipoxia y trauma (Igarashi *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Lavezzi *et al.*, 2013). En nuestro caso, las imágenes obtenidas por microscopía confocal (figuras 36-39) muestran la presencia de NeuN colocalizando con el marcaje de LC3 y P-mTOR en la corteza motora y la médula espinal lumbar de los animales tratados, lo que sugiere que este factor de transcripción también se ve alterado por el tratamiento con L-BMAA. Este hallazgo puede estar relacionado con la alteración en los sistemas de transcripción observados en la ELA (revisados por Strong, 2010), si bien consideramos que es necesario profundizar más en este punto.

5.6.6. El análisis de caspasa-3 indica un incremento de neuronas apoptóticas en médula espinal y corteza motora

Dados los numerosos signos de daño neuronal encontrados en el tejido nervioso de los animales tratados con L-BMAA, incluyendo la activación de procesos autofágicos y la pérdida de volumen del parénquima de la corteza motora, nos propusimos investigar a continuación si se estaba produciendo muerte neuronal por apoptosis en los tejidos seleccionados. La apoptosis se encuentra entre los principales mecanismo de muerte celular y se conoce como la vía de muerte celular programada (Lee *et al.*, 2012). Además, existe una conexión entre la autofagia y la apoptosis, dado que datos recientes apoyan la inducción por autofagia, de forma dependiente e independiente de caspasas, de la muerte celular (Ghavami *et al.*, 2014). Aun así, todavía no se han aclarado totalmente los mecanismos reguladores que interconectan la apoptosis y la autofagia. En la figura 60 se resumen las tres principales vías de activación de la autofagia: la vía intrínseca o mitocondrial, la vía extrínseca que responde a la activación de receptores de muerte y la vía activada por el estrés de RE.

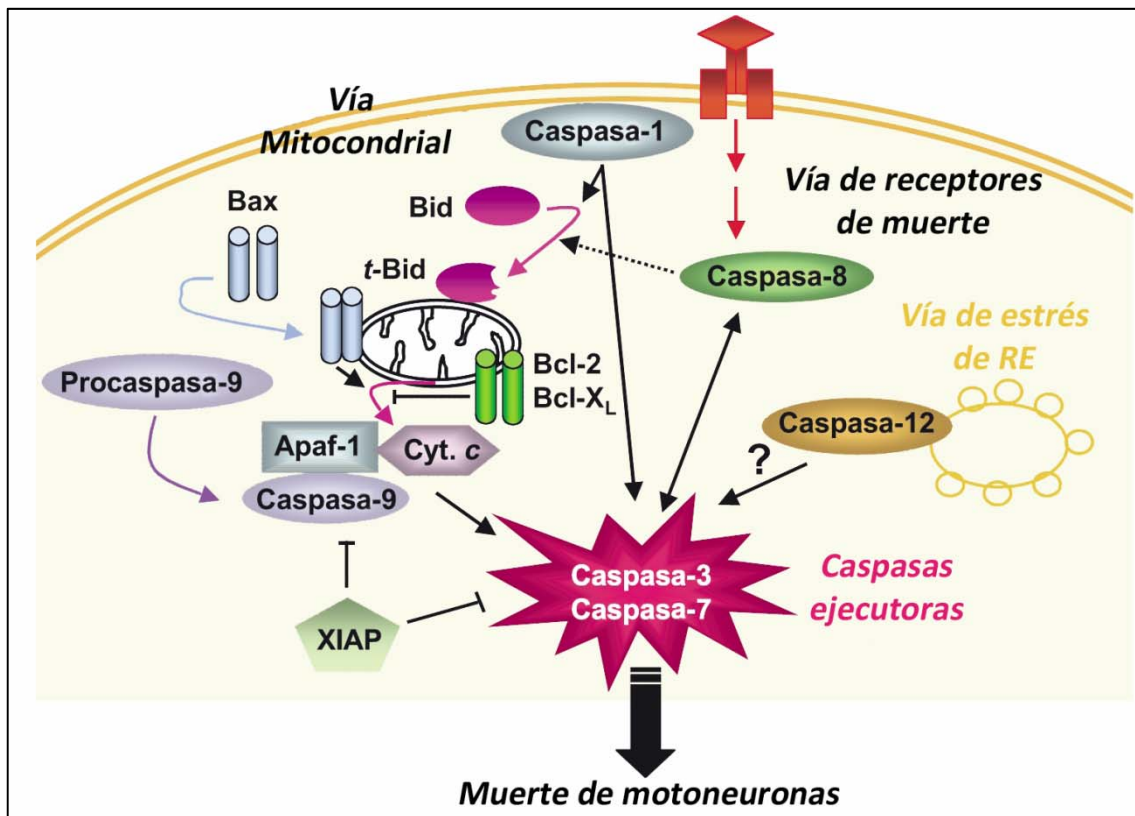


Figura 60: Vías moleculares de la muerte celular programada (MCP). Hasta la fecha, se han reconocido por lo menos tres vías moleculares distintas de MCP: la vía intrínseca o mitocondrial, la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía de RE. En la vía mitocondrial, la translocación de las proteínas Bax y Bid desde el citosol a la mitocondria, promueve la muerte celular mediante la inducción de la liberación de citocromo c (Cyt. c) desde la mitocondria al citosol; aunque tanto la Bid completa como la Bid truncada (t-Bid) se translocan a la mitocondria, t-Bid es la forma más activa biológica. Una vez en el citosol, el citocromo c activa, en presencia de Apaf-1, a la caspasa-9, la cual, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras. Esta vía se puede inhibir por la proteína antiapoptótica Bcl-2 y por la proteína inhibidora de caspasa “inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP.). En la vía de receptores de muerte, la caspasa-8 es activada por los receptores de muerte (miembros de la familia TNFR) en la membrana plasmática mediante la mediación de proteínas adaptadoras. Los receptores de muerte incluyen Fas (CD95) y el receptor de neurofilina de baja afinidad (p75NTR). La caspasa-8 activada activa entonces a las caspasas ejecutoras, directa o indirectamente, a través de la activación de Bid. El estrés de RE, incluyendo la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} y la acumulación excesiva de proteínas, también

puede resultar en apoptosis a través de la activación de la caspasa-12. La activación de la caspasa-1, la enzima clave responsable de la activación de la IL-1, también resulta en la activación de las caspasas ejecutoras y mejora, al menos en parte a través del corte de Bid, la activación de la vía apoptótica dependiente de la mitocondria. Adaptado de Guégan y Przedborski, 2003.

Las caspasas están presentes en el citoplasma como procaspasas (la forma inactiva) y se activan por proteólisis, cumpliendo funciones centrales durante la apoptosis en las células de los mamíferos (Ghavami *et al.*, 2014). Se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su función: las caspasas iniciadoras (la caspasa-8 y la caspasa-9) que se activan por las señales que promueven la apoptosis, y estas a su vez activan a las caspasas ejecutoras (como la caspasa-3 y la caspasa-7) (Ghavami *et al.*, 2014). La caspasa-3 es uno de los primeros ejecutores de la apoptosis, jugando un papel esencial en la iniciación y la regulación de los eventos proteolíticos que conducen a la muerte celular (D'Amelio *et al.*, 2012). Por lo tanto, la detección de la caspasa-3 activada puede ser una herramienta valiosa y específica para la identificación de células apoptóticas tempranas en secciones de tejidos, incluso antes de la aparición de las características morfológicas típicas de la apoptosis (Lavezzi *et al.*, 2013).

Nuestros resultados apuntan a un aumento de la caspasa-3 activada en el área perinuclear de las motoneuronas de la médula espinal lumbar inducida por el tratamiento con L-BMAA (figura 40). Este hecho concuerda con nuestros anteriores hallazgos, basados en la ultraestructura celular, respecto a la presencia de una importante alteración mitocondrial y la desestructuración del RE en las motoneuronas de la médula espinal lumbar. La activación de la procaspasa-3 también se ha observado en la médula espinal de pacientes con ELA (Martin, 1999).

Sin embargo, no hemos encontrado este incremento de caspasa-3 activa en la corteza motora, lo que puede implicar que las neuronas de esta región del cerebro estén menos dañadas que las de la médula espinal o que la pérdida neuronal más importante se ha producido en un momento previo al análisis realizado (más probable debido a la disminución del volumen en la corteza). Este resultado, junto con la menor activación de la autofagia en la corteza motora, hace pensar que en el momento de los

análisis, los procesos deletéreos provocados por el tratamiento con L-BMAA son más activos en la médula espinal que en la corteza motora. Este hecho puede explicarse a través de uno de los posibles mecanismos que se ha propuesto en la patogénesis de la ELA y de la acción del L-BMAA, como es la excitotoxicidad mediada por los receptores de glutamato. Se ha sugerido que las motoneuronas son más susceptibles al glutamato dado el bajo número de receptores GluR2 o a una disminución en la edición del ARN e los receptores AMPA en su superficie, que las hace vulnerables a una elevada entrada de Ca^{2+} y a la disfunción mitocondrial (Kwak y Kawahara, 2005). Además, en una revisión de Bogaert *et al.* (2010) se indica que algunas subpoblaciones de motoneuronas tienen una baja expresión de proteínas que unen calcio, lo que da lugar a una capacidad de tamponar Ca^{2+} reducida y que las hace más susceptibles a la excitotoxicidad.

La presencia de eventos apoptóticos detectada en nuestro modelo coincide con los hallazgos encontrados en numerosos trabajos tanto en pacientes de ELA como en los modelos genéticos de la enfermedad. Previamente, Martin (1999) describió numerosos signos morfológicos de apoptosis en muestras de médula espinal de pacientes con ELA, clasificando las neuronas apoptóticas en tres categorías: estado de cromatolisis (con el cuerpo celular hinchado, la sustancia de Nissl dispersa y el núcleo celular situado excentricamente), estado de desgaste (con el citoplasma y el núcleo condensados, el cuerpo celular encogido y una forma multipolar difusa) y estado apoptótico (con neuronas de un diámetro aproximado de la quinta parte del diámetro normal, el citoplasma y el núcleo extremadamente condensados, y una forma celular fusiforme).

Finalmente, en este estudio Martin (1999) concluyó que el mecanismo de la muerte celular programada, que implica la redistribución de proteínas de muerte celular entre las membranas y la activación de la caspasa-3, participa en la patogénesis de la ELA. En el modelos de ratón transgénico SOD1, también se han encontrado numerosos indicadores de actividad apoptótica en el sistema nervioso (revisado por Guégan y Przedborski, 2003).

En nuestro estudio, hemos encontrado numerosos signos que apoyan la idea de que la apoptosis está jugando un papel importante en la neurodegeneración causada por la acción del L-BMAA, sobre todo en la médula espinal. Estos hallazgos mimetizan los signos encontrados en los pacientes de ELA, desde la observación de núcleos típicamente apoptóticos en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (figuras 31-33), incluyendo el daño a orgánulos clave en la activación de procesos apoptóticos, como la mitocondria y el RE, hasta el marcaje en médula espinal con caspasa-3 activada.

Es un hecho bien conocido que el daño mitocondrial induce apoptosis y activación de la caspasa-3, a través de la citada vía intrínseca de activación de la apoptosis. En la médula espinal tanto de pacientes con ELA como de ratones transgénicos que expresan la proteína mutante SOD1, se produce la regulación al alza de Bax que, además, se expresa principalmente en su forma activa como homodímero, y es recolocada del citosol a la mitocondria (Martin, 1999; Vukosavic, 1999). Esta relocalización de Bax es un prerrequisito para el reclutamiento de la vía apoptótica dependiente de la mitocondria (Guégan y Przedborski, 2003).

Desde hace relativamente poco tiempo, a las dos vías principales de activación de la apoptosis, la intrínseca y la extrínseca, se le ha añadido la vía dependiente del estrés de RE. El excesivo estrés de RE provocado por la acumulación de proteínas mal plegadas, conduce a la apoptosis (Oyadomari y Mori, 2004; Rao *et al.*, 2004). En relación con el estudio de la ELA, Atkin *et al.* (2008) encontraron en la médula espinal de pacientes con ELA esporádica las señales correspondientes a una UPR completa, es decir, inducción de kinasas sensibles al estrés, de chaperonas y de mediadores apoptóticos. En un estudio reciente, Ito *et al.* (2009) investigaron los niveles de expresión de la proteína CHOP (*C/EBP homologous protein*) en la médula espinal de pacientes de ELA esporádica y en el modelo de ratón SOD1. CHOP es un factor de transcripción que se activa durante el estrés de RE (Oyadomari y Mori, 2004), y es uno de los componentes de la apoptosis mediada por estrés de RE. En la médula espinal de los pacientes con ELA esporádica, tanto el nivel de expresión de CHOP como el número de células positivas para CHOP fue muy superior al encontrado en los controles en los tres niveles estudiados, C7, T8 y L4 (Ito *et al.*, 2009).

En el caso de los animales tratados con L-BMAA, podemos confirmar que se produce una activación de los procesos apoptóticos gracias a la detección de caspasa-3 activada en secciones de médula espinal lumbar, pero hace falta profundizar más en los mecanismos subyacentes para confirmar hasta qué punto estos procesos se han desencadenado a causa del daño mitocondrial o por el estrés de RE, ya señalados en las imágenes de microscopía electrónica.

5.6.7. Los animales tratados con L-BMAA presentan alteraciones en los sistemas de neurotransmisión

Como señalan Bae *et al.* (2013), existe un debate abierto sobre el origen de la ELA, pero ahora hay un apoyo creciente a la teoría de que la hiperexcitabilidad se desarrolla debido a los orígenes corticales de la ELA. La hiperexcitabilidad en la ELA parece desarrollarse de una manera estrechamente relacionada con la interacción afectada entre dos partes diferentes del neocortex humano, las neuronas de proyección (excitatorias) y las interneuronas (inhibitorias) (Bae *et al.*, 2013). De esta forma, se produce un desequilibrio entre las interneuronas GABAérgicas y las neuronas de proyección glutamatérgicas, provocando un incremento de la hiperexcitabilidad cortical, particularmente en los estadios iniciales de la enfermedad. Aunque este no es un fenómeno exclusivo del neocortex, ya que la hiperexcitabilidad se ha descrito en las motoneuronas superiores e inferiores como una característica de la ELA en humanos y en modelos transgénicos de esta enfermedad en ratón (Martin y Chang, 2012).

Así pues, en nuestro estudio nos propusimos averiguar si en las ratas tratadas con L-BMAA se produce también esta alteración en los distintos sistemas de neurotransmisión en la corteza motora. Gracias a los análisis de los niveles de neurotransmisores en la corteza motora en distintos momentos tras el tratamiento con L-BMAA, hemos observado que existe una importante alteración de los neurotransmisores que aparece en los primeros momentos y que se mantiene a largo plazo (figuras 41 y 42).

Los mecanismos precisos que conducen a la muerte de las motoneuronas en la ELA todavía son desconocidos, aunque generalmente se acepta que la excitotoxicidad juega un papel, como acción primaria o como una consecuencia indirecta del estrés oxidativo (Leigh y Meldrum, 1996; Robberecht, 2000). Aun así, se han obtenido resultados divergentes en los trabajos publicados respecto a los niveles de neurotransmisores en el análisis de distintas muestras de pacientes, posiblemente debido a la heterogeneidad de la enfermedad y/o a las diferentes metodologías usadas para analizar el contenido en aminoácidos excitotóxicos (Dunlop *et al.*, 2013).

Nuestros resultados muestran que en los niveles de glutamato detectados justo después del tratamiento con L-BMAA, se produce un incremento que se mantiene e incluso aumenta una semana después de terminar el tratamiento. Además, estos niveles de glutamato elevados se mantienen 5 meses después, lo cual implica un daño a largo plazo en el sistema glutamatérgico o una pérdida de regulación sobre los niveles de despolarización de las neuronas glutamatérgicas. Este hecho indica que se pueden estar produciendo procesos excitotóxicos, que se mantienen bastante tiempo después de finalizar el tratamiento, y que se correlacionan con los resultados obtenidos respecto a la pérdida de volumen en la corteza motora. Estos hallazgos junto con la detección de mitocondrias dañadas en el tejido nervioso examinado, sugieren que los mecanismos de excitotoxicidad pueden jugar un papel importante en la patogénesis desarrollada por estos animales por la acción del L-BMAA. La excitotoxicidad inducida por glutamato puede provocar neurodegeneración a través de la activación de rutas enzimáticas dependientes de calcio (Bae *et al.*, 2013), como sucederían en los primeros momentos tras el tratamiento con L-BMAA. Además, también puede causar un incremento en la producción de radicales libres, que pueden causar neurodegeneración mediante el daño a los orgánulos y la regulación al alza de los mediadores proinflamatorios (Hensley *et al.*, 2006), y esta situación sería responsable de los daños a más largo plazo.

El hecho de no haber encontrado activación de caspasa-3 en la corteza motora 3 meses tras el tratamiento con L-BMAA, podría implicar que la pérdida de volumen en este área se debe a una pérdida neuronal previa, causada probablemente por el gran aumento de glutamato en los primeros momentos tras el tratamiento. Aun así, el

hecho de que estos niveles de glutamato se mantengan altos 5 meses después, implica que los procesos excitotóxicos pueden prolongarse en el tiempo.

Como ya se ha comentado, el metabolismo defectuoso del glutamato y la excitotoxicidad por glutamato han sido implicadas en la patogénesis de la ELA (Andreadou *et al.*, 2008). Spreux-Varoquaux *et al.* (2002) detectaron altas concentraciones de glutamato en el LCR de pacientes de ELA, que además se correlacionaban con el debut espinal de la enfermedad, una función de las extremidades más dañada y una tasa superior de deterioro muscular. De hecho, recientemente se ha sugerido que los niveles de glutamato podrían diferenciar a los pacientes con debut espinal de la enfermedad de los pacientes con debut bulbar. Varios autores han detectado niveles de glutamato elevados en el plasma de pacientes de ELA con debut espinal, pero no con debut bulbar (Andreadou *et al.*, 2008). De confirmarse esta hipótesis en los pacientes de ELA, la elevación de los niveles de glutamato en la corteza motora en las ratas tratadas con L-BMAA implicarían que estos animales desarrollan una patología más similar a la presentada por los pacientes con debut espinal, y podría ser una herramienta útil para dilucidar si los mecanismos patofisiológicos difieren entre estos dos grupos de pacientes.

La excitabilidad de las motoneuronas está fuertemente regulada por la inhibición sináptica mediada por la innervación presináptica glicinérgica y GABAérgica y los receptores postsinápticos de glicina (GlyR) y de GABA (GABA-A); aun así, la integridad de los sistemas inhibitorios que regulan a las motoneuronas no han sido estudiados suficientemente, a pesar de los hallazgos en la ELA humana que sugieren que deben estar afectados (Martin y Chang, 2012). Fisiológicamente, la transmisión GABAérgica en la corteza se ha considerado que provee un efecto protector para las neuronas de proyección excitatorias (Bae *et al.*, 2013). La liberación de GABA es una función de las interneuronas (que son del 20-25% de las neuronas neocorticales), tanto a nivel cortical como a nivel medular, ejerciendo un papel regulador sobre la excitación de las neuronas.

Es importante señalar que, además de la hiperexcitabilidad de las neuronas de proyección, la debilidad en la transmisión GABAérgica inhibitoria se ha documentado en estudios electrofisiológicos y patológicos en pacientes de ELA. Nihei *et al.* (1993) demostraron que las neuronas inhibitorias GABAérgicas estaban reducidas en la corteza motora de pacientes de ELA en comparación con sujetos sanos. Recientemente, Foerster *et al.* (2012), demostraron la existencia de diferencias en el contenido de GABA en la corteza motora de pacientes con ELA, mediante el uso de técnicas de espectroscopía por resonancia magnética.

En nuestro estudio hemos encontrado que el sistema GABAérgico se ve alterado también por los efectos del L-BMAA *in vivo*. A corto plazo ya se observa una disminución de los niveles de GABA, pero a largo plazo esta alteración parece ser más importante ya que aumenta la diferencia entre animales control y animales tratados. Estos resultados podrían implicar una pérdida de señalización GABAérgica en la corteza motora que iría empeorando según avanzan los síntomas neurológicos en los animales tratados con L-BMAA. Además, sugiere que la disminución del volumen en la corteza motora puede deberse a la pérdida de interneuronas GABAérgicas.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en un modelo genético de ELA, el ratón wobbler (Moser *et al.*, 2013). Nieto-González *et al.* (2010), encontraron un incremento de la excitabilidad en las neuronas piramidales de la capa 5 neocortical y una regulación a la baja de los potenciales inhibitorios mediados por GABA en las neuronas piramidales en estudios electrofisiológicos llevados a cabo en estos ratones. Además, Vucic *et al.* (2009) demostraron en pacientes con ELA, que la inhibición intracortical mediada por las interneuronas inhibitorias, estaba significativamente reducida, posiblemente por la pérdida de interneuronas.

Conjuntamente, las alteraciones que hemos descrito en las ratas tratadas con L-BMAA en los niveles de glutamato y de GABA, nos indican que los efectos de este aminoácido neurotóxico podrían estar mimetizando una importante característica de la ELA en humanos, como es la hiperexcitabilidad de las neuronas de proyección corticales debido a la pérdida de inhibición GABAérgica. Este exceso de excitación en las

neuronas de proyección podría dar lugar a los citados efectos neurodegenerativos, por el aumento del Ca^{2+} intracelular y la producción de ROS.

Otro de los aminoácidos que ha cobrado gran importancia en los últimos tiempos en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas es la taurina. La taurina está implicada en numerosos procesos, como la neuromodulación, la osmorregulación, el mantenimiento de la homeostasis del calcio, la estabilización de membrana, funciones antioxidantes, procesos antiinflamatorios y neuroprotección en el sistema nervioso central (Jung *et al.*, 2013). En nuestro estudio, hemos observado un aumento de los niveles de taurina que sólo aparece a corto plazo, posiblemente como un mecanismo de neuroprotección primario ante los efectos excitotóxicos del L-BMAA. Este incremento es más marcado justo después de terminar el tratamiento con L-BMAA y, aunque una semana después los niveles de taurina se mantienen elevados, son significativamente menores que los obtenidos en el día postratamiento 1. En el análisis a largo plazo los niveles de taurina son prácticamente iguales a los del grupo control, aunque mantienen una ligera tendencia al alza.

Como describieron Wu y Prentice (2009), la taurina juega un importante papel protector frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato, principalmente mediante tres mecanismos: inhibiendo el influjo de calcio al interior celular inducido por glutamato, inhibiendo la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares, e inhibiendo la vía apoptótica interna inducida por glutamato (figura 61).

Los datos sobre las alteraciones en los niveles de taurina en casos de ELA son escasos. Estudios antiguos en pacientes de ELA describen el incremento regional en las concentraciones de taurina en varias subdivisiones de la médula espinal cervical, aunque no en la región lumbar (Malessa *et al.*, 1991) y en algunas regiones del cerebro de pacientes de ELA (Perry *et al.*, 1987). Un estudio más reciente describe en el modelo de ratón transgénico SOD1 de ELA familiar, un incremento de taurina en el cerebro en los estados tardíos de la enfermedad (Choi *et al.*, 2009).

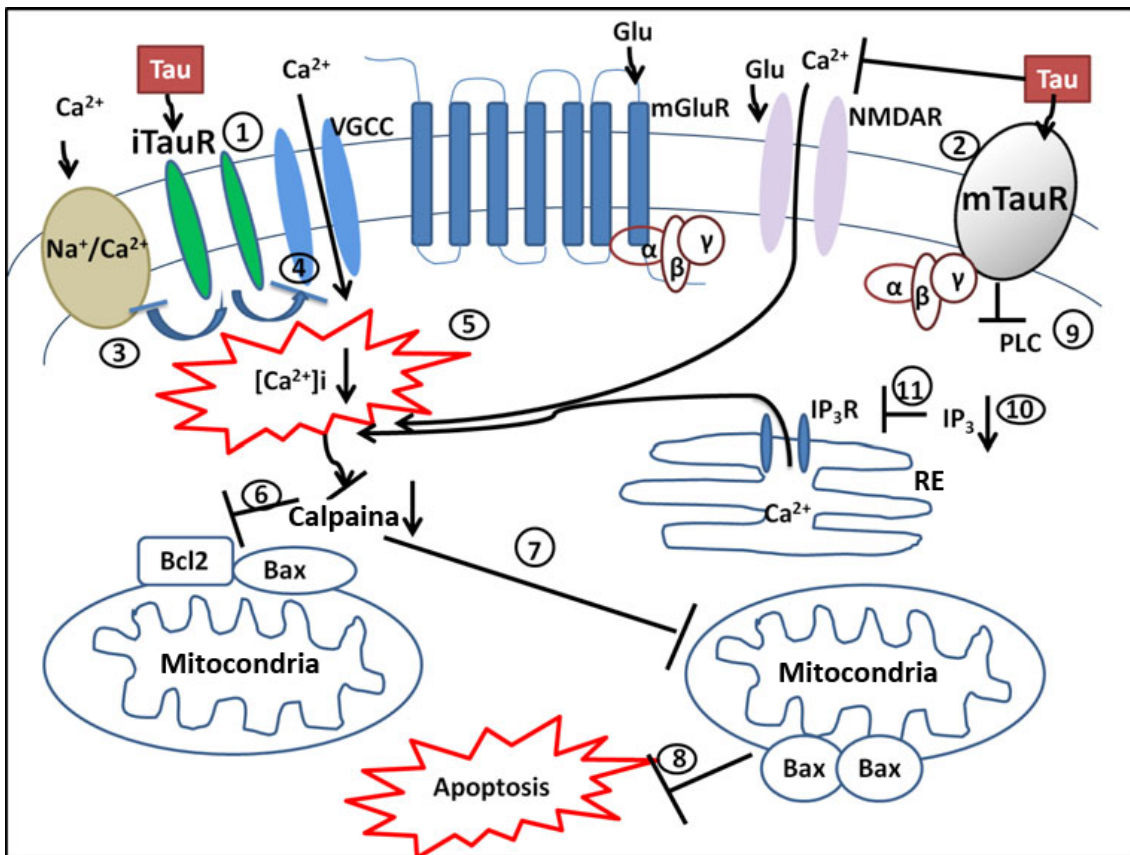


Figura 61: Descripción esquemática de los mecanismos neuroprotectores de la taurina mediante los receptores putativos de taurina. (1) Los receptores ionotrópicos de taurina (iTauR) activados y/o (2) los receptores metabotrópicos de taurina (mTauR), inhiben el modo reverso del intercambiador de sodio/calcio (3); la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) debida a la hiperpolarización inducida por taurina (4), disminuye el calcio intracelular (5), lo que a su vez provoca la inhibición de la calpaina y el corte de Bax y Bcl2 inducido por calpaina (6). El homodímero Bax es inhibido (7), resultando en la inhibición de la cascada de muerte mediada por mitocondrias (8). La fosfolipasa C (PLC) es inhibida por la activación de mTauR (acoplado a proteína G inhibidora) (9), provocando un descenso de la producción de IP₃, lo que atenúa la liberación de calcio del retículo endoplásmico (RE), causando una reducción del estrés de RE y de la apoptosis mediada por esta vía. Adaptado de Menzie et al. (2012).

En los últimos tiempos se ha dado mucha importancia a los cambios en la expresión del transportador de taurina (TauT) en las neuronas durante el curso de enfermedades neurodegenerativas. Jung *et al.* (2012) confirmaron un incremento de la expresión de TauT dependiente de la edad en las motoneuronas de la médula espinal del modelo de ratón transgénico SOD1 y un incremento similar en las motoneuronas de la médula espinal de pacientes con ELA. En dicho estudio, la elevada expresión de TauT contribuía a incrementar la absorción de taurina en las motoneuronas. Estos autores hipotetizaron que el factor de shock térmico 1 (HSF1), que se había encontrado preferentemente unido al promotor de TauT, provocaba un incremento de la expresión de TauT, facilitando así la habilidad de las motoneuronas para contrarrestar el estrés oxidativo y sobrevivir (Jung *et al.*, 2012).

Aunque los datos previos sobre la importancia de la taurina en la ELA son escasos, nuestros resultados muestran que, al menos en los momentos iniciales tras la administración del L-BMAA, los niveles de taurina aumentan, posiblemente en respuesta a los procesos excitotóxicos provocados por la elevación de los niveles de glutamato. La alteración de los niveles de TauT, ha sido propuesta como un nuevo marcador patológico para las motoneuronas sometidas a estrés en la ELA (NTs15), pero es necesario profundizar más en la posible relación entre la ELA y la taurina para confirmar el posible potencial terapéutico que pueda tener este aminoácido para contrarrestar los efectos de la excitotoxicidad.

5.6.8. Los análisis de GSK3 β indican un significativo aumento de este marcador de neurodegeneración

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para encontrar biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas, como la ELA, para conseguir un diagnóstico lo más rápido posible y claro de los pacientes. Recientemente, la ELA ha sido relacionada con la proteína GSK3, mediante el hallazgo de evidencias experimentales de alteraciones de esta enzima en pacientes de ELA (Palomo *et al.*, 2011).

Existen dos isoformas de GSK3, GSK3 α y GSK3 β , que son constitutivamente activas y se inactivan, principalmente, por fosforilación de la Ser 21 (GSK3 α) y de la Ser 9 (GSK3 β) (Sutherland *et al.*, 1993). Aunque el mecanismo de regulación de GSK3 no se conoce por completo, parece ser que se consigue un control preciso mediante una combinación de fosforilación, localización e interacciones con proteínas que unen GSK3 (Yang *et al.*, 2008). GSK3 β es particularmente abundante en el sistema nervioso central, donde es específica de neuronas (Leroy y Brion, 1999). El incremento de GSK3 β está relacionado con enfermedades neurodegenerativas, especialmente con la enfermedad de Alzheimer (Martinez *et al.*, 2011). Aun así, también se han encontrado niveles elevados de GSK3 β en la ELA (Hu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Palomo *et al.*, 2011).

A este respecto, nuestros resultados evidencian que a través del mecanismo de toxicidad del L-BMAA, puede ocurrir un incremento de la síntesis de GSK3 β total tanto en la corteza motora como en la médula espinal lumbar (figura 45). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el tratamiento con L-BMAA también aumenta los niveles de la forma inactiva, P-(Ser9)-GSK3 β . Dado que la diferencia entre GSK3 β total y fosforilado es mayor en la corteza motora y en la médula espinal lumbar de animales tratados con L-BMAA que en los animales control, queda demostrado un incremento neto de la actividad de GSK3 β . Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Yang *et al.* (2008), que demostraron un aumento de la expresión de GSK3, mediante RT-PCR, tanto en regiones corticales como en la médula espinal cervical dorsal y lumbar ventral de pacientes con ELA. En este mismo estudio, confirmaron mediante western-blot, un aumento de GSK3 β en los pacientes de ELA respecto a los controles en el tejido nervioso examinado.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal (figuras 46 y 47) confirman la elevación de la expresión de GSK3 β en las neuronas de la corteza motora, en las que se observa un importante incremento en el núcleo, y en las motoneuronas espinales, donde se aprecian grandes concentraciones de GSK3 β . Estas concentraciones han sido constatadas en la médula espinal lumbar en el citosol y, en menor medida, en el núcleo, gracias a las imágenes obtenidas por inmunohistoquímica por microscopía electrónica (figuras 48). Estos resultados también concuerdan con el estudio de Yang

et al. (2008), que observaron neuronas inmunoreactivas a GSK3 β en la corteza frontal de pacientes de ELA, de forma que las neuronas aparecían llenas con depósitos intraneuronales homogéneos de GSK3 β .

La subida de los niveles de GSK3 β en el núcleo que indican las imágenes de corteza motora y médula espinal lumbar, concuerda con los resultados de Muñoz-Sáez *et al.* (2013), que encontraron un importante incremento de GSK3 β en el núcleo de células SH-SY5Y tras el tratamiento con L-BMAA. La acumulación de GSK3 β en el núcleo ocurre en respuesta a daños celulares que inducen muerte celular, previamente a la activación de la cascada de caspasas (Bijur y Jope, 2001). El hecho de que el marcaje nuclear de GSK3 β aparezca más pronunciado en las imágenes obtenidas de corteza motora que en las de médula espinal, podría indicar que las neuronas de la corteza motora se encuentran aún en el estadio previo a la activación de la cascada de caspasas, mientras que las motoneuronas de la médula espinal podrían estar en un estado más avanzado de afectación. Este aspecto sin embargo necesitaría un estudio más profundo para aportar datos más concluyentes.

Los niveles de GSK3 β elevados hallados en los animales tratados son de gran relevancia dado el papel central que juega esta enzima en la supervivencia celular. Es un hecho bien establecido que GSK3 promueve la señalización apoptótica intrínseca en las neuronas, y la sobreexpresión de GSK3 es suficiente para inducir apoptosis en cultivos celulares (Pap y Cooper, 1998; Bijur *et al.*, 2000) y en el cerebro de ratón (Lucas *et al.*, 2001). Como señalan Jope y Johnson (2004), se ha demostrado que la activación de GSK3 promueve la apoptosis bajo una gran variedad de condiciones, como las producidas en varias enfermedades neurodegenerativas, y ha sido ligado a la apoptosis inducida, entre otros, por el estrés de retículo endoplásmico o por toxinas mitocondriales.

Es importante señalar que los mayores niveles de GSK3 β encontrados en los animales tratados con L-BMAA se encuentran en la médula espinal lumbar, tejido en el que se ha podido constatar la activación de procesos apoptóticos.

Por lo tanto, en nuestro modelo de intoxicación con L-BMAA, GSK3 β puede jugar un papel clave aportando una conexión entre los diversos daños provocados por esta toxina, como las diversas alteraciones observadas en los orgánulos celulares, y la muerte celular señalada por la activación de procesos apoptóticos, la pérdida de volumen en la corteza motora y el agrandamiento ventricular.

5.6.9. Los análisis de TDP-43 indican la presencia de formas aberrantes y agregados de este biomarcador de ELA

Por otra parte, era importante investigar si en nuestro modelo de intoxicación con L-BMAA se producía una de las principales características patomoleculares de la ELA, los agregados proteicos intraneuronales. La agregación y depósito de proteínas ubiquitinadas en células neuronales y gliales es una característica de numerosas enfermedades neurodegenerativas, como la AD, la PD, la FTLD y la ELA (Zhang *et al.*, 2009). Recientemente se ha identificado la proteína TDP-43 como el principal componente de las inclusiones, principalmente citoplásmicas, observadas en la ELA (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006). Normalmente, TDP-43 se localiza en el núcleo, ejerciendo un papel en la regulación de la expresión génica, y los agregados patológicos en el citoplasma se asocian con la depleción de la proteína nuclear (Igaz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009).

Por lo tanto, actualmente la investigación sobre la ELA se ha centrado en el papel de TDP-43 en la neurodegeneración (Igaz *et al.*, 2011). Como se ha descrito anteriormente, el L-BMAA puede unirse al ARNt de la serina y se incorpora erróneamente a las cadenas polipeptídicas, por lo que la cadena proteica no puede plegarse apropiadamente (Holtcamp, 2012, Dunlop *et al.*, 2013), lo que proporciona una conexión entre la exposición a este aminoácido neurotóxico y los acúmulos proteicos detectados en la ELA.

Nuestros datos sugieren que el L-BMAA aumenta la expresión de TDP-43 y las formas de alto peso molecular de TDP-43 en la corteza motora (figura 49) que pueden producirse por la inclusión de este aminoácido en TDP-43. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal no solo confirman la presencia de agregados proteicos de TDP-43 colocalizando con ubiquitina en las neuronas de la corteza motora, sino que además

apuntan a un efecto similar en la médula espinal (figuras 50 y 51). En las motoneuronas de la médula espinal, se observa un gran incremento de TDP-43, así como la formación de agregados tanto de TDP-43 con ubiquitina como de ubiquitina sola, lo cual señala que se producen agregados de otras proteínas además de TDP-43. Estos resultados implican una importante presencia de agregados proteicos que podrían ser el resultado de la alteración de la síntesis proteica, como ya apuntaban las imágenes obtenidas del retículo endoplásmico fragmentado y la gran presencia de autofagosomas (figuras 31 y 32).

Los resultados obtenidos por microscopía electrónica confirman que en los animales tratados con L-BMAA se produce una salida de TDP-43 del núcleo al citoplasma, donde forma agregados, aunque en este caso el marcaje de TDP-43 es más abundante en las motoneuronas espinales (figura 53) que en las neuronas de la corteza motora (figura 52), lo que podría ser indicativo de que el proceso neurodegenerativo es más activo en las motoneuronas espinales.

Se han identificado inclusiones proteicas intracelulares con forma de madeja en neuronas de la médula espinal de pacientes con ELA, que son positivas para el marcaje con TDP-43 y para el marcaje con ubiquitina (Arai *et al.*, 2006; Mackenzie *et al.*, 2007). Arai *et al.* (2006) describieron otro tipo de inclusiones en la médula espinal de casos de ELA positivas para TDP-43, incluyendo inclusiones redondeadas compactas, inclusiones intranucleares neuronales e inclusiones citoplásmicas gliales. Otros estudios han detectado la presencia de agregados con forma de madeja en neuronas de la corteza frontotemporal, incluyendo el giro dentado hipocampal (Nishihira *et al.*, 2008) en pacientes de ELA esporádica. La colocalización de TDP-43 y ubiquitina ha sido confirmada en las inclusiones con forma de madeja, en las motoneuronas inferiores en pacientes de ELA (Mackenzie *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007), pero no en los cuerpos de Bunina.

Además, Philips *et al.* (2013) no sólo confirmaron la presencia de inclusiones positivas para TDP-43 en las motoneuronas de la médula espinal de pacientes con ELA esporádica, sino que también las hallaron en los oligodendrocitos, lo cual implica que la alteración de TDP-43 y la agregación proteica también afecta a estas células.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio revelan una importante colocalización de TDP-43 con ubiquitina en el citoplasma de las neuronas de la corteza motora y de la médula espinal lumbar, que corresponderían con las inclusiones con forma de madeja descritas en la ELA esporádica. Estos resultados señalan que el tratamiento con L-BMAA *in vivo*, mimetiza una de las principales características fisiopatológicas de la ELA esporádica.

La pérdida de función de TDP-43 debida al corte inapropiado, la translocación desde el núcleo o su secuestro dentro de inclusiones, puede jugar un importante papel en la neurodegeneración (Zhang *et al.*, 2009). Se ha descrito que la pérdida de TDP-43 *in vitro* provoca dismorfismo nuclear, desregulación del ciclo celular y apoptosis (Ayala *et al.*, 2008). Adicionalmente, Sumi *et al.* (2008) sugirieron que los niveles de expresión de TDP-43 en el núcleo de las neuronas están asociado con el curso clínico y los cambios neurodegenerativos en pacientes de ELA esporádica.

Recientemente, Moujalled *et al.* (2013) demostraron *in vitro* que la inhibición de diversas kinasas, sobre todo de la vía de las MAPK, modulaba la formación de gránulos de TDP-43 y de estrés global, mientras que otros inhibidores eran más específicos de la acumulación de TDP-43, incluyendo inhibidores de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y de GSK3 que, además, evitan la formación de fragmentos C-termina de TDP-43. Por lo tanto, GSK3 se identifica como una kinasa clave asociada con la formación de gránulos de estrés positivos para TDP-43 (Moujalled *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en el presente estudio se han identificado de los principales rasgos característicos de la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas tras el tratamiento *in vivo* con L-BMAA, la elevación de los niveles de GSK3 β y la formación de agregados proteicos positivos para TDP-43 y ubiquitina. Aunque no se ha podido demostrar la aparición de fragmentos C-terminales de TDP-43, en trabajos previos realizados *in vitro* en nuestro laboratorio mediante el tratamiento con L-BMAA en células de neuroblastoma humano, se han identificado tanto fragmentos C-terminales de TDP-43 como formas de alto peso molecular (Muñoz-Sáez *et al.*, 2013).

5.7. Los animales tratados con L-BMAA pueden constituir un modelo experimental de ELA esporádica

Hasta el momento, el modelo transgénico de SOD1 murino es el más aceptado para el estudio de la ELA (Gurney, 1994; Nagai *et al.*, 2001), pero hay que tener en cuenta que en este modelo genético los síntomas avanzan muy rápido desde el debut de la enfermedad y se alcanza un estado irreversible en un periodo de tiempo muy corto (3 o 4 meses). A la vista de todos los resultados expuestos anteriormente, podemos decir que el modelo animal por tratamiento con L-BMAA que se describe en esta memoria, presenta síntomas neurológicos y patofisiológicos similares a los que presentan los enfermos de ELA. La gran ventaja de este modelo respecto al genético es que la afectación de los animales evoluciona de forma lenta y gradual, y el empeoramiento no llega a ser letal en el periodo máximo de tiempo observado (14 meses). Este hecho nos ha permitido llevar a cabo un estudio más pormenorizado de la evolución de los efectos neurológicos y alcanzar un estado de afectación potencialmente reversible que podría servir para el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas para combatir esta enfermedad sin cura en la actualidad.

5.1. El inhibidor de GSK3, VP2.51, tiene efectos neuroprotectores en las fases iniciales del tratamiento con L-BMAA

Para constatar la posible utilidad de este modelo de ELA esporádica para el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas, se iniciaron una serie de estudios sobre los efectos de VP2.51, un inhibidor de GSK3, sobre los animales tratados previamente con L-BMAA. Este inhibidor se administró en dos momentos distintos tras el tratamiento con L-BMAA, el en día 1 postratamiento (PT1) y en el día 30 postratamiento (PT30), como ya se indicó en el apartado 3.12, para conocer su capacidad terapéutica.

Tras la evaluación de la afectación neurológica de los distintos grupos, se constató que el VP2.51 no causa por sí solo efectos neurológicos deletéreos en los animales, lo cual es un punto de partida clave para poder continuar con el ensayo de esta molécula.

El VP2.51 tuvo un efecto claramente neuroprotector cuando se administró a partir del primer día tras el tratamiento con el L-BMAA (PT1) (figura 55). Los síntomas neurológicos de estos animales mejoraron notablemente. No sólo se frenó la evolución de los síntomas, sino que la evaluación neurológica mejoró casi hasta el nivel de los controles en el plazo de tres meses. Sin embargo, la administración del inhibidor en el día 30 postratamiento con L-BMAA, no tuvo el mismo efecto neuroprotector, siguiendo los síntomas de estos animales una evolución similar a la presentada por los animales tratados sólo con L-BMAA.

Estos resultados respecto a la capacidad del VP2.51 para contrarrestar los efectos del L-BMAA *in vivo*, nos indican que esta molécula resulta más efectiva justo al final del tratamiento con L-BMAA, es decir, cuando los procesos excitotóxicos están más activos, tal y como indicaban las elevadas concentraciones de glutamato registradas nada más terminar el tratamiento con este aminoácido neurotóxico.

Otros autores han resaltado el potencial de los inhibidores de GSK3 para restaurar o disminuir los daños provocados al sistema nervioso central por distintos factores, como enfermedades neurodegenerativas o intervenciones quirúrgicas. Numerosos estudios han demostrado que la inhibición genética o farmacológica de GSK3 protege a las neuronas de un amplio rango de estreses ambientales, incluyendo la hipoxia y la toxicidad amiloide, lo que puede ser relevante para el tratamiento de los accidentes cerebrovasculares o enfermedades como el Alzheimer (Cole, 2012).

King *et al.* (2013) realizaron una amplia revisión sobre la capacidad de los inhibidores de GSK3 para recuperar o mejorar los déficits cognitivos tras diversos tipos de daños al sistema nervioso central. En este trabajo se describe que entre los mecanismos a través de los cuales estos inhibidores ejercen sus efectos se encuentran la neurogénesis, la reducción de la inflamación y el incremento de numerosos mecanismos de neuroprotección.

Más concretamente, Palomo *et al.* (2011) destacaron la importancia de la participación de GSK3 en el proceso de la ELA, revisando diversos estudios experimentales en los que se utilizaron inhibidores de GSK3, en modelos animales y celulares y, también, en estudios clínicos que mostraron el potencial del papel terapéutico de estas moléculas.

Respecto al VP2.51, varios autores han destacado su potencial terapéutico en varias enfermedades neurodegenerativas. Morales-García *et al.* (2012) demostraron *in vitro* que la inhibición de GSK3 con VP2.51, y con otros inhibidores de GSK3, induce la proliferación, migración y diferenciación de células madre neurales hacia un fenotipo neuronal, proponiendo a los inhibidores de GSK3 como drogas potencialmente terapéuticas para las enfermedades neurodegenerativas y para el daño cerebral. Adicionalmente, Beurel *et al.* (2013) utilizaron el VP2.51 en un modelo experimental de Esclerosis Múltiple (EM) en ratones, el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Sus resultados mostraron que la administración de inhibidores selectivos de GSK3, entre ellos el VP2.51, reducía significativamente los síntomas clínicos de la glicoproteína₃₅₋₅₅ de la mielina de los oligodendrocitos inducida por la EAE en ratones, eliminando casi por completo la fase progresiva crónica, y reduciendo también el número de células Th1 y Th17 en la médula espinal (Beurel *et al.*, 2013).

Por todo lo expuesto anteriormente, es lógico pensar que el VP2.51 puede ser capaz de mitigar e incluso subsanar varias de las alteraciones producidas por el L-BMAA mediante la inhibición selectiva de GSK3.

Dado que obtuvimos resultados positivos en el grupo de animales tratados con L-BMAA más VP2.51 a PT1 respecto a la recuperación de los síntomas motores, investigamos las posibles acciones de VP2.51 sobre las vías autofágicas descritas anteriormente en los animales tratados con L-BMAA.

Los análisis realizados en muestras de corteza motora, revelaron que el tratamiento con VP2.51 por sí sólo no afecta al grado de autofagia medido a través de los niveles de LC3B y P-mTOR. Sin embargo, la administración de VP2.51 en el PT1 tras el tratamiento previo con L-BMAA, provoca la disminución de LC3B y la concomitante disminución de P-mTOR respecto al grupo tratado sólo con L-BMAA, hasta niveles similares a los obtenidos en el grupo control. Así pues, podemos deducir que, en el

caso de la corteza motora, el VP2.51 produce una disminución o evita la activación de los procesos autofágicos provocados por el L-BMAA.

Sin embargo, los resultados en la médula espinal lumbar difieren de los encontrados en la corteza motora. Aunque el grupo tratado solamente con VP2.51 no muestra diferencias respecto al grupo control, si se observa cierta tendencia al alza en los niveles de LC3B y P-mTOR. Este hecho podría indicar que en la médula espinal el inhibidor de GSK3 está provocando una ligera activación de los procesos autofágicos.

Aun así, la administración de VP2.51 a PT1 tras el tratamiento con L-BMAA parece evitar también la activación de los procesos autofágicos, dada la disminución encontrada en los niveles de LC3B en los animales sometidos a este tratamiento respecto a los animales tratados sólo con L-BMAA. Si bien, en este caso no se ha encontrado una disminución significativa de los niveles de P-mTOR respecto al grupo de L-BMAA, si se aprecia cierta tendencia a disminuir. Teniendo en cuenta que la activación de la vía dependiente de mTOR es menor en la médula espinal lumbar que en la corteza motora de los animales tratados con L-BMAA, es posible que la inhibición de la autofagia por VP2.51 en la médula espinal esté actuando sobre otra vía autofágica.

La acción neuroprotectora del VP2.51 necesitaría un estudio más profundo, utilizando diferentes dosis del inhibidor en diferentes momentos tras el tratamiento con L-BMAA. No obstante, el efecto protector que aquí se describe es muy prometedor y apoya la idoneidad del modelo de ELA esporádica que se propone en esta tesis para el ensayo de moléculas potencialmente útiles para el tratamiento de la ELA.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

El objetivo principal de esta tesis es la búsqueda de un modelo experimental de ELA esporádica en rata por administración del aminoácido neurotóxico L-BMAA. De acuerdo con los resultados obtenidos hemos llegado a las siguientes conclusiones.

1. Para la obtención de efectos neurológicos que mimeticen los presentados en la ELA, el tratamiento más adecuado en rata con el aminoácido neurotóxico L-BMAA, se fija en 5 administraciones por vía intraperitoneal de 300 mg/kg en días consecutivos, siendo la edad más sensible para iniciar el tratamiento y lograr una afectación a corto plazo al destete (21 días postnatales).
2. Los síntomas evolucionan en una fase inicial rápida, dentro de los 3 primeros meses postratamiento, seguida de una fase más estable en la que se van desarrollando de forma más lenta y gradual. Los animales tratados con L-BMAA muestran una disminución de la coordinación motora y un fallo en el reflejo del aterrizaje que indican una pérdida del control motor.
3. En animales tratados con el L-BMAA que manifiestan ya síntomas importantes de afectación neurológica, se observa que, el aminoácido neurotóxico produce daño oxidativo en hígado y riñón, pero no compromete la vida del animal dado que ambos órganos siguen siendo funcionales. Por lo tanto, los efectos deletéreos observados no se deben a otros factores externos al sistema nervioso central, validando este modelo para el estudio de los efectos centrales del L-BMAA.
4. El daño oxidativo en el hígado y los riñones y la evolución de la afectación neurológica a largo plazo en los animales tratados con L-BMAA, nos llevan a pensar que este neurotóxico se bioacumula en tejidos, justificando así su rápida desaparición en sangre, y se libera lentamente prolongando así sus efectos deletéreos.

5. La pérdida de volumen de la musculatura de las patas traseras en los animales tratados, podría implicar atrofia muscular y pérdida de innervación desde las motoneuronas de la médula espinal, aunque estos animales no perdieron totalmente la capacidad locomotora en el periodo estudiado. Este efecto se corresponde con uno de los rasgos fundamentales de la ELA.
6. Los animales tratados con L-BMAA presentan una disminución del volumen de la corteza motora, tratándose de un daño muy focalizado sobre regiones concretas implicadas en el control del movimiento, así como un gran aumento del volumen de los ventrículos laterales. Estas alteraciones pueden ser compatibles con la neurodegeneración en la ELA.
7. El núcleo motor del trigémino y del núcleo del tracto solitario, dos núcleos bulbares implicados en el control motor de la deglución, se encuentran afectados por el tratamiento con esta neurotoxina. Estas alteraciones pueden ser compatibles con la sintomatología y la patología de la ELA.
8. Los animales tratados presentan una disminución de los ratios NAA/Cho, NAA/Cr y NAA/Cr+Cho, indicando la disfunción o la pérdida neuronal tanto en la corteza motora como en la médula espinal lumbar.
9. Las neuronas de la corteza motora y las motoneuronas de la médula espinal lumbar se ven afectadas por el tratamiento con L-BMAA, mostrando un retículo endoplásmico desorganizado y fragmentado, con numerosos polirribosomas libres. Las mitocondrias aparecen hinchadas y con abundantes vacuolas. Estos hechos forman parte del mecanismo patológico del proceso degenerativo de la ELA.
10. En corteza motora y médula espinal lumbar se produce un incremento de la autofagia probado por la presencia de autofagosomas y el incremento de la proteína marcadora de autofagia LC3. El tratamiento por el L-BMAA activa la vía autofágica dependiente de mTOR.

11. Las motoneuronas espinales de los animales tratados presentan abundante caspasa-3 activa, hecho que indica una alta actividad apoptótica a causa del tratamiento con L-BMAA.
12. Las neuronas de la corteza motora y las motoneuronas de la médula espinal lumbar de los animales tratados presentan un importante aumento del marcador de neurodegeneración GSK3 β , así como de formas aberrantes y agregados, frecuentemente ubiquitinados, del biomarcador de ELA TDP-43.
13. La posible molécula terapéutica VP2.51, inhibidor de GSK3, tiene un efecto neuroprotector en las fases iniciales tras del tratamiento con L-BMAA, frenando la afectación neurológica y la activación de los procesos autofágicos.

Todas las conclusiones expuestas anteriormente nos llevan a proponer a las ratas tratadas con L-BMAA como un buen modelo experimental animal de ELA esporádica. Éste puede ser de gran utilidad tanto para conocer los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad como para el estudio de moléculas potencialmente terapéuticas para el tratamiento de la ELA.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott J. (2008). "The blood–brain barrier and its relevance to pathogenesis and therapy in neurodegenerative disease." *Amyotrophic Lateral Sclerosis.*, 9(Suppl. 1), 1.
- Abdulla, E. M., Campbell, I. C. (1993). "l-BMAA and kainate-induced modulation of neurofilament concentrations as a measure of neurite outgrowth: Implications for an in vitro test of neurotoxicity." *Toxicol. In Vitro*, 7(4), 341-344.
- Abel, E. L. (2007). "Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis." *Percept. Mot. Skills.*, 104(3 Pt 2), 1251-1254.
- Abrahams, S., Goldstein, L. H., Suckling, J., Ng, V., Simmons, A., Chitnis, X., Atkins, L., Williams, S. C., Leigh, P. N. (2005). "Frontotemporal white matter changes in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neurol.*, 252(3), 321-331.
- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." *Methods Enzymol.*, 105, 121-126.
- Agosta, F., Pagani, E., Rocca, M. A., Caputo, D., Perini, M., Salvi, F., Prella, A., Filippi, M. (2007). "Voxel-based morphometry study of brain volumetry and diffusivity in amyotrophic lateral sclerosis patients with mild disability." *Hum. Brain Mapp.*, 28(12), 1430-1438.
- Agostini, M., Tucci, P., Melino, G. (2011). "Cell death pathology: perspective for human diseases." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 414(3), 451-455.
- Al-Chalabi, A., Jones, A., Troakes, C., King, A., Al Sarraj, S., van den Berg, L. H. (2012). "The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Neuropathol.*, 124(3), 339-352.
- Al-Sammak, M. A., Hoagland, K. D., Snow, D. D., Cassada, D. (2013). "Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples." *Toxicon*, 76, 316-325.
- Al-Sammak, M. A., Hoagland, K. D., Cassada, D., Snow, D. D. (2014). "Co-occurrence of the Cyanotoxins BMAA, DABA and Anatoxin-a in Nebraska Reservoirs, Fish, and Aquatic Plants." *Toxins. (Basel)*, 6(2), 488-508.
- Albano, R., Liu, X., Lobner, D. (2013). "Regulation of system xc⁻ in the SOD1-G93A mouse model of ALS." *Exp. Neurol.*, 250, 69-73.

- Albrecht, J. (1998). "Roles of neuroactive amino acids in ammonia neurotoxicity." *J. Neurosci. Res.*, 51(2), 133-138.
- Almer, G., Guegan, C., Teismann, P., Naini, A., Rosoklija, G., Hays, A. P., Chen, C., Przedborski, S. (2001). "Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann. Neurol.*, 49(2), 176-185.
- Alonso, A., Logroscino, G., Jick, S. S., Hernan, M. A. (2010). "Association of smoking with amyotrophic lateral sclerosis risk and survival in men and women: a prospective study." *BMC. Neurol.*, 10, 6.
- Álvarez-Uria Tejero, M. J., Saiz, A. A., Fernández, R. C., Santamarta Liébana, M. E., Costilla, G. S. (2011). "[Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: advances in magnetic resonance imaging]." *Radiologia.*, 53(2), 146-155.
- Anand, P., Parrett, A., Martin, J., Zeman, S., Foley, P., Swash, M., Leigh, P. N., Cedarbaum, J. M., Lindsay, R. M., Williams-Chestnut, R. E. (1995). "Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease." *Nat. Med.*, 1(2), 168-172.
- Andersson, M., Karlsson, O., Bergstrom, U., Brittebo, E. B., Brandt, I. (2013). "Maternal Transfer of the Cyanobacterial Neurotoxin beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) via Milk to Suckling Offspring." *PLoS. One.*, 8(10), e78133.
- Andjus, P. R., Bataveljic, D., Vanhoutte, G., Mitrecic, D., Pizzolante, F., Djogo, N., Nicaise, C., Gankam, K. F., Gangitano, C., Michetti, F., van der, L. A., Pochet, R., Bacic, G. (2009). "In vivo morphological changes in animal models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's-like disease: MRI approach." *Anat. Rec. (Hoboken.)*, 292(12), 1882-1892.
- Andreadou, E., Kapaki, E., Kokotis, P., Paraskevas, G. P., Katsaros, N., Libitaki, G., Petropoulou, O., Zis, V., Sfagos, C., Vassilopoulos, D. (2008). "Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *In Vivo*, 22(1), 137-141.
- Angenstein, F., Niessen, H. G., Goldschmidt, J., Vielhaber, S., Ludolph, A. C., Scheich, H. (2004). "Age-dependent changes in MRI of motor brain stem nuclei in a mouse model of ALS." *Neuroreport*, 15(14), 2271-2274.

- Aoki, M., Warita, H., Mizuno, H., Suzuki, N., Yuki, S., and Itoyama, Y. (2011). "Feasibility study for functional test battery of SOD transgenic rat (H46R) and evaluation of edaravone, a free radical scavenger." *Brain Res.*, 1382, 321-325.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., Oda, T. (2006). "TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351(3), 602-611.
- Armon, C. (2009). "Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS." *Neurology*, 73(20), 1693-1698.
- Ashburner, J., Friston, K. J. (2000). "Voxel-based morphometry--the methods." *Neuroimage.*, 11(6 Pt 1), 805-821.
- Atkin, J. D., Farg, M. A., Walker, A. K., McLean, C., Tomas, D., Horne, M. K. (2008). "Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Neurobiol. Dis.*, 30(3), 400-407.
- Ayala, Y. M., Misteli, T., Baralle, F. E. (2008). "TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(10), 3785-3789.
- Bae, J. S., Simon, N. G., Menon, P., Vucic, S., Kiernan, M. C. (2013). "The puzzling case of hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Clin. Neurol*, 9(2), 65-74.
- Bains, J. S., Shaw, C. A. (1997). "Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death." *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 25(3), 335-358.
- Banack, S. A., Cox, P. A. (2003). "Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam." *Neurology.*, 61(3), 387-389.
- Banack, S. A., Johnson, H. E., Cheng, R., Cox, P. A. (2007). "Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium." *Mar. Drugs.*, 5(4), 180-196.
- Banack, S. A., Downing, T. G., Spacil, Z., Purdie, E. L., Metcalf, J. S., Downing, S., Esterhuizen, M., Codd, G. A., Cox, P. A. (2010 a). "Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB)." *Toxicon.*, 56(6), 868-879.

- Banack, S. A., Caller, T. A., Stommel, E. W. (2010 b). "The cyanobacteria derived toxin Beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis." *Toxins*. (Basel)., 2(12), 2837-2850.
- Baptista, M. S., Cianca, R. C., Lopes, V. R., Almeida, C. M., Vasconcelos, V. M. (2011). "Determination of the non protein amino acid beta-N-methylamino-l-alanine in estuarine cyanobacteria by capillary electrophoresis." *Toxicon*, 58(5), 410-414.
- Barber, S. C., Shaw, P. J. (2010). "Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target." *Free Radic. Biol. Med.*, 48(5), 629-641.
- Basak, M., Erturk, M., Oflazoglu, B., Ozel, A., Yildiz, G. B., Forta, H. (2002). "Magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Neurol. Scand.*, 105(5), 395-399.
- Bataveljic, D., Djogo, N., Zupunski, L., Bajic, A., Nicaise, C., Pochet, R., Bacic, G., Andjus, P. R. (2009). "Live monitoring of brain damage in the rat model of amyotrophic lateral sclerosis." *Gen. Physiol Biophys.*, 28 Spec No:212-8., 212-218.
- Ben Hamida, M., Hentati, F., Ben Hamida, C. (1990). "Hereditary motor system diseases (chronic juvenile amyotrophic lateral sclerosis). Conditions combining a bilateral pyramidal syndrome with limb and bulbar amyotrophy." *Brain*, 113 (Pt 2), 347-363.
- Berciano, J., Zarranz, J. J., Polo, J. M. (2003). "Enfermedad degenerativa espinal y espinocerebelosas." *Neurología*, Tercera ed. Madrid. Elsevier España, 689-695.
- Beurel, E., Kaidanovich-Beilin, O., Yeh, W. I., Song, L., Palomo, V., Michalek, S. M., Woodgett, J. R., Harrington, L. E., Eldar-Finkelman, H., Martínez, A., Joze, R. S. (2013). "Regulation of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis by glycogen synthase kinase-3." *J. Immunol.*, 190(10), 5000-5011.
- Bidigare, R. R., Christensen, S. J., Wilde, S. B., Banack, S. A. (2009). "Cyanobacteria and BMAA: possible linkage with avian vacuolar myelinopathy (AVM) in the south-eastern United States." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:71-3., 71-73.
- Bijur, G. N., De Sarno, P., Joze, R. S. (2000). "Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium." *J. Biol. Chem.*, 275(11), 7583-7590.

- Bijur, G. N., Jope, R. S. (2001). "Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta." *J. Biol. Chem.*, 276(40), 37436-37442.
- Bijur, G. N., Jope, R. S. (2003). "Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria." *Neuroreport*, 14(18), 2415-2419.
- Blair, I. P., Bennett, C. L., Abel, A., Rabin, B. A., Griffin, J. W., Fischbeck, K. H., Cornblath, D. R., Chance, P. F. (2000). "A gene for autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4) localizes to a 500-kb interval on chromosome 9q34." *Neurogenetics.*, 3(1), 1-6.
- Bogaert, E., d'Ydewalle, C., Van Den, B. L. (2010). "Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target." *CNS. Neurol Disord. Drug Targets.*, 9(3), 297-304.
- Boillee, S., Peschanski, M., Junier, M. P. (2003). "The wobbler mouse: a neurodegeneration jigsaw puzzle." *Mol. Neurobiol.*, 28(1), 65-106.
- Borenstein, A. R., Mortimer, J. A., Schofield, E., Wu, Y., Salmon, D. P., Gamst, A., Olichney, J., Thal, L. J., Silbert, L., Kaye, J., Craig, U. L., Schellenberg, G. D., Galasko, D. R. (2007). "Cycad exposure and risk of dementia, MCI, and PDC in the Chamorro population of Guam." *Neurology*, 68(21), 1764-1771.
- Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M. J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R., Lipton, S. A. (2003). "Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15(6), 706-716.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bradley, W. G., Mash, D. C. (2009). "Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:7-20., 7-20.
- Brand, L. E. (2009). "Human exposure to cyanobacteria and BMAA." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:85-95., 85-95.
- Brand, L. E., Pablo, J., Compton, A., Hammerschlag, N., Mash, D. C. (2010). "Cyanobacterial Blooms and the Occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs." *Harmful. Algae.*, 9(6), 620-635.

- Brockington, A., Ning, K., Heath, P. R., Wood, E., Kirby, J., Fusi, N., Lawrence, N., Wharton, S. B., Ince, P. G., Shaw, P. J. (2013). "Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: motor neurons resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity." *Acta Neuropathol.*, 125(1), 95-109.
- Brownson, D. M., Mabry, T. J., Leslie, S. W. (2002). "The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells." *J. Ethnopharmacol.*, 82(2-3), 159-167.
- Bucher, S., Braunstein, K. E., Niessen, H. G., Kaulisch, T., Neumaier, M., Boeckers, T. M., Stiller, D., Ludolph, A. C. (2007). "Vacuolization correlates with spin-spin relaxation time in motor brainstem nuclei and behavioural tests in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of ALS." *Eur. J. Neurosci.*, 26(7), 1895-1901.
- Buenz, E. J., Howe, C. L. (2007). "Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo." *Neurotoxicology.*, 28(3), 702-704.
- Buisson, A., Choi, D. W. (1995). "The inhibitory mGluR agonist, S-4-carboxy-3-hydroxy-phenylglycine selectively attenuates NMDA neurotoxicity and oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death." *Neuropharmacology*, 34(8), 1081-1087.
- Caller, T. A., Doolin, J. W., Haney, J. F., Murby, A. J., West, K. G., Farrar, H. E., Ball, A., Harris, B. T., Stommel, E. W. (2009). "A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: a possible role for toxic cyanobacteria blooms." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:101-8., 101-108.
- Caller, T. A., Field, N. C., Chipman, J. W., Shi, X., Harris, B. T., Stommel, E. W. (2012). "Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 13(1), 25-32.
- Campbell, R. J., Steele, J. C., Cox, T. A., Loerzel, A. J., Belli, M., Belli, D. D., Kurland, L. T. (1993). "Pathologic findings in the retinal pigment epitheliopathy associated with the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam." *Ophthalmology*, 100(1), 37-42.
- Carew, J. D., Nair, G., Andersen, P. M., Wu, J., Gronka, S., Hu, X., Benatar, M. (2011 a). "Presymptomatic spinal cord neurometabolic findings in SOD1-positive people at risk for familial ALS." *Neurology*, 77(14), 1370-1375.

- Carew, J. D., Nair, G., Pineda-Alonso, N., Usher, S., Hu, X., Benatar, M. (2011 b). "Magnetic resonance spectroscopy of the cervical cord in amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 12(3), 185-191.
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z., Lamberta, R., Weiss, J. H. (1995). "In vitro kainate injury to large, SMI-32(+) spinal neurons is Ca²⁺ dependent." *Neuroreport*, 6(6), 945-948.
- Carriedo, S. G., Sensi, S. L., Yin, H. Z., Weiss, J. H. (2000). "AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro." *J. Neurosci.*, 20(1), 240-250.
- Cervantes Cianca, R. C., Baptista, M. S., Lopes, V. R., Vasconcelos, V. M. (2012). "The non-protein amino acid beta-N-methylamino-L-alanine in Portuguese cyanobacterial isolates." *Amino. Acids*, 42(6), 2473-2479.
- Chan, D. C. (2006). "Mitochondrial fusion and fission in mammals." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 79-99.
- Chance, P. F., Rabin, B. A., Ryan, S. G., Ding, Y., Scavina, M., Crain, B., Griffin, J. W., Cornblath, D. R. (1998). "Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34." *Am. J. Hum. Genet.*, 62(3), 633-640.
- Chang, D. T., Reynolds, I. J. (2006). "Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons." *Prog. Neurobiol.*, 80(5), 241-268.
- Chang, Y. C., Chiu, S. J., Kao, K. P. (1993). "beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decreases brain glutamate receptor number and induces behavioral changes in rats." *Chin J. Physiol*, 36(2), 79-84.
- Chen, N., Luo, T., Raymond, L. A. (1999). "Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability." *J. Neurosci.*, 19(16), 6844-6854.
- Chen, S., Zhang, X., Song, L., Le, W. (2012). "Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis." *Brain Pathol.*, 22(1), 110-116.
- Cheng, R., Banack, S. A. (2009). "Previous studies underestimate BMAA concentrations in cycad flour." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:41-3., 41-43.

- Cheroni, C., Peviani, M., Cascio, P., Debiasi, S., Monti, C., Bendotti, C. (2005). "Accumulation of human SOD1 and ubiquitinated deposits in the spinal cord of SOD1G93A mice during motor neuron disease progression correlates with a decrease of proteasome." *Neurobiol. Dis.*, 18(3), 509-522.
- Chio, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R., Mora, G. (2005). "Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players." *Brain.*, 128(Pt 3), 472-476.
- Choi, J. K., Kustermann, E., Dedeoglu, A., Jenkins, B. G. (2009). "Magnetic resonance spectroscopy of regional brain metabolite markers in FALS mice and the effects of dietary creatine supplementation." *Eur. J. Neurosci.*, 30(11), 2143-2150.
- Codd, G. A., Metcalf, J. S., Beattie, K. A. (1999). "Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria." *Toxicon*, 37(8), 1181-1185.
- Codd, G. A., Morrison, L. F., Metcalf, J. S. (2005). "Cyanobacterial toxins: risk management for health protection." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203(3), 264-272.
- Cole, A. R. (2012). "GSK3 as a Sensor Determining Cell Fate in the Brain." *Front Mol. Neurosci.*, 5, 4.
- Combes, A., El Abdellaoui, S., Sarazin, C., Vial, J., Mejean, A., Ploux, O., Pichon, V. (2013). "Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine in complex environmental samples." *Anal. Chim. Acta*, 771, 42-49.
- Copani, A., Canonico, P. L., Nicoletti, F. (1990). "Beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a potent agonist of 'metabotropic' glutamate receptors." *Eur. J. Pharmacol.*, 181(3), 327-328.
- Copani, A., Canonico, P. L., Catania, M. V., Aronica, E., Bruno, V., Ratti, E., van Amsterdam, F. T., Gaviraghi, G., Nicoletti, F. (1991). "Interaction between beta-N-methylamino-L-alanine and excitatory amino acid receptors in brain slices and neuronal cultures." *Brain Res.*, 558(1), 79-86.

- Cosottini, M., Cecchi, P., Piazza, S., Pesaresi, I., Fabbri, S., Diciotti, S., Mascalchi, M., Siciliano, G., Bonuccelli, U. (2013). "Mapping cortical degeneration in ALS with magnetization transfer ratio and voxel-based morphometry." *PLoS. One.*, 8(7), e68279.
- Costa, J., Gomes, C., de Carvalho, M. (2010). "Diagnosis, pathogenesis and therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis." *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets.*, 9(6), 764-778.
- Cowan, C. M., Raymond, L. A. (2006). "Selective neuronal degeneration in Huntington's disease." *Curr. Top. Dev. Biol.*, 75, 25-71.
- Cox, P. A., Sacks, O. W. (2002). "Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam." *Neurology*, 58(6), 956-959.
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J. (2003). "Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(23), 13380-13383.
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., Bergman, B. (2005). "Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(14), 5074-5078.
- Cox, P. A., Richer, R., Metcalf, J. S., Banack, S. A., Codd, G. A., Bradley, W. G. (2009). "Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:109-17., 109-117.
- Cox, T. A., McDarby, J. V., Lavine, L., Steele, J. C., Calne, D. B. (1989). "A retinopathy on Guam with high prevalence in Lytico-Bodig." *Ophthalmology*, 96(12), 1731-1735.
- Cozzolino, M., Ferri, A., Carri, M. T. (2008). "Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications." *Antioxid. Redox. Signal.*, 10(3), 405-443.
- Craighead, D., Metcalf, J. S., Banack, S. A., Amgalan, L., Reynolds, H. V., Batmunkh, M. (2009). "Presence of the neurotoxic amino acids beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diamino-butyric acid (DAB) in shallow springs from the Gobi Desert." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:96-100., 96-100.

- Crippa, V., Carra, S., Rusmini, P., Sau, D., Bolzoni, E., Bendotti, C., De Biasi, S., Poletti, A. (2010). "A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases." *Autophagy*, 6(7), 958-960.
- Cruz-Aguado, R., Winkler, D., Shaw, C. A. (2006). "Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice." *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 84(2), 294-299.
- Cucchiaroni, M. L., Viscomi, M. T., Bernardi, G., Molinari, M., Guatteo, E., Mercuri, N. B. (2010). "Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative beta-N-Methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons." *J. Neurosci.*, 30(15), 5176-5188.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M. R. (2004). "Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants." *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 28(5), 771-799.
- D'Amelio, M., Sheng, M., Cecconi, F. (2012). "Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis." *Trends Neurosci.*, 35(11), 700-709.
- Damiano, M., Starkov, A. A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint, B. M., Manfredi, G. (2006). "Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice." *J. Neurochem.*, 96(5), 1349-1361.
- Davison, A. N., Dobbing, J. (1966). "Myelination as a vulnerable period in brain development." *Br. Med. Bull.*, 22(1), 40-44.
- Dawson, R., Jr., Marschall, E. G., Chan, K. C., Millard, W. J., Eppler, B., Patterson, T. A. (1998). "Neurochemical and neurobehavioral effects of neonatal administration of beta-N-methylamino-L-alanine and 3,3'-iminodipropionitrile." *Neurotoxicol. Teratol.*, 20(2), 181-192.
- de Munck, E., Muñoz-Sáez, E., Antonio, M. T., Pineda, J., Herrera, A., Miguel, B. G., Arahuetes, R. M. (2012). "Effect of beta-N-methylamino-L-alanine on oxidative stress of liver and kidney in rat." *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 35(2), 193-199.

- de Munck, E., Muñoz-Sáez, E., Miguel, B. G., Solas, M. T., Ojeda, I., Martínez, A., Gil, C., Arahuetes, R. M. (2013). "beta-N-methylamino-l-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): the first step towards an experimental model for sporadic ALS." *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 36(2), 243-255.
- De Vos, K. J., Grierson, A. J., Ackerley, S., Miller, C. C. (2008). "Role of axonal transport in neurodegenerative diseases." *Annu. Rev. Neurosci.*, 31, 151-173.
- Dhaliwal, G. K., Grewal, R. P. (2000). "Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains." *Neuroreport*, 11(11), 2507-2509.
- Dodds, W. J., Stewart, E. T., Logemann, J. A. (1990). "Physiology and radiology of the normal oral and pharyngeal phases of swallowing." *AJR Am. J. Roentgenol.*, 154(5), 953-963.
- Downing, S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Downing, T. G. (2014). "The fate of the cyanobacterial toxin beta-N-methylamino-l-alanine in freshwater mussels." *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 101, 51-58.
- Duncan, M. W., Steele, J. C., Kopin, I. J., Markey, S. P. (1990). "2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam." *Neurology*, 40(5), 767-772.
- Duncan, M. W., Villacreses, N. E., Pearson, P. G., Wyatt, L., Rapoport, S. I., Kopin, I. J., Markey, S. P., Smith, Q. R. (1991). "2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258(1), 27-35.
- Dunlop, R. A., Cox, P. A., Banack, S. A., Rodgers, K. J. (2013). "The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation." *PLoS. One.*, 8(9), e75376.
- Ellgaard, L., Helenius, A. (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4(3), 181-191.
- Elliott, J. L., Snider, W. D. (1996). "Motor neuron growth factors." *Neurology*, 47(4 Suppl 2), S47-S53.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." *Arch. Biochem. Biophys.*, 82(1), 70-77.

- Engskog, M. K., Karlsson, O., Haglof, J., Elmsjo, A., Brittebo, E., Arvidsson, T., Pettersson, C. (2013). "The cyanobacterial amino acid beta-N-methylamino-L-alanine perturbs the intermediary metabolism in neonatal rats." *Toxicology*, 312C, 6-11.
- Esterhuizen, M., Downing, T. G. (2008). "Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates." *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71(2), 309-313.
- Evans, M. C., Couch, Y., Sibson, N., Turner, M. R. (2013). "Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis." *Mol. Cell Neurosci.*, 53, 34-41.
- Faassen, E. J., Gillissen, F., Zweers, H. A., Lurling, M. (2009). "Determination of the neurotoxins BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) and DAB (alpha,gamma-diaminobutyric acid) by LC-MSMS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:79-84., 79-84.
- Falconer, I. R., Choice, A., Hosja, W. (1992). "Toxicity of edible mussels (*Mytilus edulis*) growing naturally in an estuary during waterbloom of the blue-green alga *Nodularia spumigena*." *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 7, 119-123.
- Ferrucci, M., Fulceri, F., Toti, L., Soldani, P., Siciliano, G., Paparelli, A., Fornai, F. (2011). "Protein clearing pathways in ALS." *Arch. Ital. Biol.*, 149(1), 121-149.
- Filippini, N., Douaud, G., Mackay, C. E., Knight, S., Talbot, K., Turner, M. R. (2010). "Corpus callosum involvement is a consistent feature of amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology*, 75(18), 1645-1652.
- Foerster, B. R., Callaghan, B. C., Petrou, M., Edden, R. A., Chenevert, T. L., Feldman, E. L. (2012). "Decreased motor cortex gamma-aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology*, 78(20), 1596-1600.
- Foerster, B. R., Pomper, M. G., Callaghan, B. C., Petrou, M., Edden, R. A., Mohamed, M. A., Welsh, R. C., Carlos, R. C., Barker, P. B., Feldman, E. L. (2013). "An imbalance between excitatory and inhibitory neurotransmitters in amyotrophic lateral sclerosis revealed by use of 3-T proton magnetic resonance spectroscopy." *JAMA Neurol*, 70(8), 1009-1016.

- Fogal, B., Li, J., Lobner, D., McCullough, L. D., Hewett, S. J. (2007). "System x(c)- activity and astrocytes are necessary for interleukin-1 beta-mediated hypoxic neuronal injury." *J. Neurosci.*, 27(38), 10094-10105.
- Frank, B., Haas, J., Heinze, H. J., Stark, E., Munte, T. F. (1997). "Relation of neuropsychological and magnetic resonance findings in amyotrophic lateral sclerosis: evidence for subgroups." *Clin. Neurol Neurosurg.*, 99(2), 79-86.
- Gallo, V., Bueno-De-Mesquita, H. B., Vermeulen, R., Andersen, P. M., Kyrozi, A., Linseisen, J., Kaaks, R., Allen, N. E., Roddam, A. W., Boshuizen, H. C., Peeters, P. H., Palli, D., Mattiello, A., Sieri, S., Tumino, R., Jimenez-Martin, J. M., Diaz, M. J., Suarez, L. R., Trichopoulou, A., Agudo, A., Arriola, L., Barricante-Gurrea, A., Bingham, S., Khaw, K. T., Manjer, J., Lindkvist, B., Overvad, K., Bach, F. W., Tjonneland, A., Olsen, A., Bergmann, M. M., Boeing, H., Clavel-Chapelon, F., Lund, E., Hallmans, G., Middleton, L., Vineis, P., Riboli, E. (2009). "Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort." *Ann. Neurol.*, 65(4), 378-385.
- Gandhi, S., Abramov, A. Y. (2012). "Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration." *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2012, 428010.
- Genazzani, A. A., Casabona, G., L'Episcopo, M. R., Condorelli, D. F., Dell'Albani, P., Shinozaki, H., Nicoletti, F. (1993). "Characterization of metabotropic glutamate receptors negatively linked to adenylyl cyclase in brain slices." *Brain Res.*, 622(1-2), 132-138.
- Geser, F., Martinez-Lage, M., Kwong, L. K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. (2009). "Amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia and beyond: the TDP-43 diseases." *J. Neurol.*, 256(8), 1205-1214.
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A. R., Kashani, H. H., Hashemi, M., Owji, A. A., Los, M. J. (2014). "Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders." *Prog. Neurobiol.*, 112, 24-49.
- Gong, L., Zhang, Q. L., Zhang, N., Hua, W. Y., Huang, Y. X., Di, P. W., Huang, T., Xu, X. S., Liu, C. F., Hu, L. F., Luo, W. F. (2012). "Neuroprotection by urate on 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease: linking to Akt/GSK3beta signaling pathway." *J. Neurochem.*, 123(5), 876-885.

- Goto, J. J., Koenig, J. H., Ikeda, K. (2012). "The physiological effect of ingested beta-N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an in vivo preparation." *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.*, 156(3-4), 171-177.
- Graves, M. C., Fiala, M., Dinglasan, L. A., Liu, N. Q., Sayre, J., Chiappelli, F., van Kooten, C., Vinters, H. V. (2004). "Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and T cells." *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, 5(4), 213-219.
- Gros-Louis, F., Gaspar, C., Rouleau, G. A. (2006). "Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Biochim. Biophys. Acta*, 1762(11-12), 956-972.
- Grosskreutz, J., Kaufmann, J., Fradrich, J., Dengler, R., Heinze, H. J., Peschel, T. (2006). "Widespread sensorimotor and frontal cortical atrophy in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *BMC. Neurol.*, 6, 17.
- Guegan, C., Przedborski, S. (2003). "Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Clin. Invest*, 111(2), 153-161.
- Guengerich, F. P. (1984). "Effects of nutritive factors on metabolic processes involving bioactivation and detoxication of chemicals." *Annu. Rev. Nutr.*, 4, 207-231.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X. (1994). "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." *Science*, 264(5166), 1772-1775.
- Gurney, M. E. (1994). "Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *N. Engl. J. Med.*, 331(25), 1721-1722.
- Hall, E. D., Oostveen, J. A., Gurney, M. E. (1998). "Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS." *Glia*, 23(3), 249-256.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., Bading, H. (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." *Nat. Neurosci.*, 5(5), 405-414.
- Hasegawa, M., Arai, T., Nonaka, T., Kametani, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T. G., Buratti, E., Baralle, F., Morita, M., Nakano, I., Oda, T., Tsuchiya, K., Akiyama, H. (2008). "Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Ann. Neurol*, 64(1), 60-70.

- Hashmi, M., Anders, M. W. (1991). "Enzymatic reaction of beta-N-methylaminoalanine with L-amino acid oxidase." *Biochim. Biophys. Acta*, 1074(1), 36-39.
- Hecht, M. J., Fellner, F., Fellner, C., Hilz, M. J., Neundorfer, B., Heuss, D. (2002). "Hyperintense and hypointense MRI signals of the precentral gyrus and corticospinal tract in ALS: a follow-up examination including FLAIR images." *J. Neurol. Sci.*, 199(1-2), 59-65.
- Hellwig, C. T., Passante, E., Rehm, M. (2011). "The molecular machinery regulating apoptosis signal transduction and its implication in human physiology and pathophysiologies." *Curr. Mol. Med.*, 11(1), 31-47.
- Henke, K. R. (2014). "Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment 1st ed." John Wiley & Sons Ltd. , United Kingdom..
- Henkel, J. S., Engelhardt, J. I., Siklos, L., Simpson, E. P., Kim, S. H., Pan, T., Goodman, J. C., Siddique, T., Beers, D. R., Appel, S. H. (2004). "Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue." *Ann. Neurol*, 55(2), 221-235.
- Hensley, K., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, M., Williamson, K. S. (2006). "On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Antioxid. Redox. Signal.*, 8(11-12), 2075-2087.
- Hentati, A., Bejaoui, K., Pericak-Vance, M. A., Hentati, F., Speer, M. C., Hung, W. Y., Figlewicz, D. A., Haines, J., Rimmler, J., Ben Hamida, C. (1994). "Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35." *Nat. Genet.*, 7(3), 425-428.
- Hentati, A., Ouahchi, K., Pericak-Vance, M. A., Nijhawan, D., Ahmad, A., Yang, Y., Rimmler, J., Hung, W., Schlotter, B., Ahmed, A., Ben Hamida, M., Hentati, F., Siddique, T. (1998). "Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers." *Neurogenetics.*, 2(1), 55-60.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A. M., Brown, R. H., Glimcher, L. H. (2009). "XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy." *Genes Dev.*, 23(19), 2294-2306.

- Hirano, M., Angelini, C., Montagna, P., Hays, A. P., Tanji, K., Mitsumoto, H., Gordon, P. H., Naini, A. B., DiMauro, S., Rowland, L. P. (2008). "Amyotrophic lateral sclerosis with ragged-red fibers." *Arch. Neurol*, 65(3), 403-406.
- Holtcamp, W. (2012). "The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease?" *Environ. Health Perspect.*, 120(3), A110-A116.
- Hu, J. H., Zhang, H., Wagey, R., Krieger, C., Pelech, S. L. (2003). "Protein kinase and protein phosphatase expression in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." *J. Neurochem.*, 85(2), 432-442.
- Hubert, G. W., Paquet, M., Smith, Y. (2001). "Differential subcellular localization of mGluR1a and mGluR5 in the rat and monkey Substantia nigra." *J. Neurosci.*, 21(6), 1838-1847.
- Hursthouse, M. B., Motevalli, M., O'Brien, P., Nunn, P. B. (1990). "Notes. X-Ray crystal structure of a copper(II) complex of the neurotoxic amino acid, DL-alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid." *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985-1987.
- Igarashi, T., Huang, T. T., Noble, L. J. (2001). "Regional vulnerability after traumatic brain injury: gender differences in mice that overexpress human copper, zinc superoxide dismutase." *Exp. Neurol*, 172(2), 332-341.
- Igaz, L. M., Kwong, L. K., Chen-Plotkin, A., Winton, M. J., Unger, T. L., Xu, Y., Neumann, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2009). "Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies." *J. Biol. Chem.*, 284(13), 8516-8524.
- Igaz, L. M., Kwong, L. K., Lee, E. B., Chen-Plotkin, A., Swanson, E., Unger, T., Malunda, J., Xu, Y., Winton, M. J., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2011). "Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice." *J. Clin. Invest*, 121(2), 726-738.
- Ikeda, K., Murata, K., Kawase, Y., Kawabe, K., Kano, O., Yoshii, Y., Takazawa, T., Hirayama, T., Iwasaki, Y. (2013). "Relationship between cervical cord 1H-magnetic resonance spectroscopy and clinoco-electromyographic profile in amyotrophic lateral sclerosis." *Muscle Nerve*, 47(1), 61-67.

- Ilieva, E. V., Ayala, V., Jove, M., Dalfo, E., Cacabelos, D., Povedano, M., Bellmunt, M. J., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otin, M. (2007). "Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Brain*, 130(Pt 12), 3111-3123.
- Ince, P. G., Codd, G. A. (2005). "Return of the cycad hypothesis - does the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health?" *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 31(4), 345-353.
- Ince, P. G., Wharton, S. B. (2007). "Chapter 5 Cytopathology of the motor neuron." *Handb. Clin. Neurol*, 82, 89-119.
- Inukai, Y., Nonaka, T., Arai, T., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T. G., Buratti, E., Baralle, F. E., Akiyama, H., Hisanaga, S., Hasegawa, M. (2008). "Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLD-U and ALS." *FEBS Lett.*, 582(19), 2899-2904.
- Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H., Hara, H. (2009). "Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice." *Neurobiol. Dis.*, 36(3), 470-476.
- Jaiswal, M. K., Zech, W. D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carri, M. T., Nau, R., Keller, B. U. (2009). "Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease." *BMC. Neurosci.*, 10, 64.
- Jiang, L., Johnston, E., Aberg, K. M., Nilsson, U., Ilag, L. L. (2013). "Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS." *Anal. Bioanal. Chem.*, 405(4), 1283-1292.
- Jiang, L., Eriksson, J., Lage, S., Jonasson, S., Shams, S., Mehine, M., Ilag, L. L., Rasmussen, U. (2014). "Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments." *PLoS. One.*, 9(1), e84578.
- Jiao, Y., Chen, Q., Chen, X., Wang, X., Liao, X., Jiang, L., Wu, J., Yang, L. (2014). "Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin beta-methylamino-l-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk." *Sci. Total Environ.*, 468-469C, 457-463.

- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spacil, Z., Ilag, L. L., Ronnevi, L. O., Rasmussen, U., Bergman, B. (2010). "Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(20), 9252-9257.
- Joep, R. S., Johnson, G. V. (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." *Trends Biochem. Sci.*, 29(2), 95-102.
- Jung, M. K., Kim, K. Y., Lee, N. Y., Kang, Y. S., Hwang, Y. J., Kim, Y., Sung, J. J., McKee, A., Kowall, N., Lee, J., Ryu, H. (2013). "Expression of taurine transporter (TauT) is modulated by heat shock factor 1 (HSF1) in motor neurons of ALS." *Mol. Neurobiol.*, 47(2), 699-710.
- Kalra, S., Arnold, D. L. (2006). "Magnetic resonance spectroscopy for monitoring neuronal integrity in amyotrophic lateral sclerosis." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 576, 275-282.
- Kalra, S., Hanstock, C. C., Martin, W. R., Allen, P. S., Johnston, W. S. (2006). "Detection of cerebral degeneration in amyotrophic lateral sclerosis using high-field magnetic resonance spectroscopy." *Arch. Neurol*, 63(8), 1144-1148.
- Karamyan, V. T., Speth, R. C. (2008). "Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review." *Life Sci.*, 82(5-6), 233-246.
- Karlsson, O., Berg, C., Brittebo, E. B., Lindquist, N. G. (2009 a). "Retention of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine in melanin and neuromelanin-containing cells--a possible link between Parkinson-dementia complex and pigmentary retinopathy." *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22(1), 120-130.
- Karlsson, O., Lindquist, N. G., Brittebo, E. B., Roman, E. (2009 b). "Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents." *Toxicol. Sci.*, 109(2), 286-295.
- Karlsson, O., Roman, E., Berg, A. L., Brittebo, E. B. (2011). "Early hippocampal cell death, and late learning and memory deficits in rats exposed to the environmental toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) during the neonatal period." *Behav. Brain Res.*, 219(2), 310-320.

- Karlsson, O., Berg, A. L., Lindstrom, A. K., Hanrieder, J., Arnerup, G., Roman, E., Bergquist, J., Lindquist, N. G., Brittebo, E. B., Andersson, M. (2012). "Neonatal Exposure to the Cyanobacterial Toxin BMAA Induces Changes in Protein Expression and Neurodegeneration in Adult Hippocampus." *Toxicol. Sci.*, 130(2), 391-404.
- Karlsson, O., Bergquist, J., Andersson, M. (2013 a). "Quality measures of imaging mass spectrometry aids in revealing long-term striatal protein changes induced by neonatal exposure to the cyanobacterial toxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA)." *Mol. Cell Proteomics.*, 13(1), 93-104.
- Karlsson, O., Kultima, K., Wadensten, H., Nilsson, A., Roman, E., Andren, P. E., Brittebo, E. B. (2013 b). "Neurotoxin-Induced Neuropeptide Perturbations in Striatum of Neonatal Rats." *J. Proteome. Res.*, 12(4), 1678-1690.
- Karlsson, O., Jiang, L., Andersson, M., Ilag, L. L., Brittebo, E. B. (2014). "Protein association of the neurotoxin and non-protein amino acid BMAA (beta-N-Methylamino-L-Alanine) in the liver and brain following neonatal administration in rats." *Toxicol. Lett.*, 226(1), 1-5.
- Kato, S., Shaw, P., Wood-Allum, C., Leigh, N. P., Shaw, C. E. (2014). "Amyotrophic lateral sclerosis." *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. 1st ed. Basel: Blackwell Publishing, 350-371.
- Kaufmann, P., Pullman, S. L., Shungu, D. C., Chan, S., Hays, A. P., Del Bene, M. L., Dover, M. A., Vukic, M., Rowland, L. P., Mitsumoto, H. (2004). "Objective tests for upper motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." *Neurology*, 62(10), 1753-1757.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., McGeer, P. L. (1992). "Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue." *Am. J. Pathol.*, 140(3), 691-707.
- King, A. E., Dickson, T. C., Blizzard, C. A., Woodhouse, A., Foster, S. S., Chung, R. S., Vickers, J. C. (2011). "Neuron-glia interactions underlie ALS-like axonal cytoskeletal pathology." *Neurobiol. Aging.*, 32(3), 459-469.
- King, M. K., Pardo, M., Cheng, Y., Downey, K., Jope, R. S., Beurel, E. (2013). "Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments." *Pharmacol. Ther.*, 141(1), 1-12.

- Kolind, S., Sharma, R., Knight, S., Johansen-Berg, H., Talbot, K., Turner, M. R. (2013). "Myelin imaging in amyotrophic and primary lateral sclerosis." *Amyotroph. Lateral. Scler. Frontotemporal. Degener.*, 14(7-8), 562-573.
- Kollewe, K., Korner, S., Dengler, R., Petri, S., Mohammadi, B. (2012). "Magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurol Res. Int.*, 2012, 608501.
- Kong, J., Xu, Z. (1998). "Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1." *J. Neurosci.*, 18(9), 3241-3250.
- Korolchuk, V. I., Menzies, F. M., Rubinsztein, D. C. (2010). "Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems." *FEBS Lett.*, 584(7), 1393-1398.
- Krasnianski, A., Deschauer, M., Neudecker, S., Gellerich, F. N., Muller, T., Schoser, B. G., Krasnianski, M., Zierz, S. (2005). "Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies." *Brain*, 128(Pt 8), 1870-1876.
- Kuftinec, M. M., Miller, S. A. (1972). "Alkaline and acid phosphatase activities during growth of long bones and mandibles." *Calcif. Tissue Res.*, 9(3), 173-178.
- Kurland, L. T., Mulder, D. W. (1954 a). "Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution and special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations." *Neurology*, 4(6), 438-448.
- Kurland, L. T., Mulder, D. W. (1954 b). "Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations." *Neurology*, 4(5), 355-378.
- Kushnir, M. M., Bergquist, J. (2009). "Beta-methylamino-L-alanine analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry with iTRAQ as the derivative." *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng.)*, 15(3), 439-443.
- Kwak, S., Kawahara, Y. (2005). "Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Mol. Med. (Berl)*, 83(2), 110-120.

- Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del Favero, J., Desmet, F., Marklund, S. L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van, M., I, Al Chalabi, A., Bornes, S., Musson, R., Hansen, V., Beckman, L., Adolfsson, R., Pall, H. S., Prats, H., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Katayama, S., Awata, T., Leigh, N., Lang-Lazdunski, L., Dewerchin, M., Shaw, C., Moons, L., Vlietinck, R., Morrison, K. E., Robberecht, W., van Broeckhoven, C., Collen, D., Andersen, P. M., Carmeliet, P. (2003). "VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death." *Nat. Genet.*, 34(4), 383-394.
- Lavezzi, A. M., Corna, M. F., Matturri, L. (2013). "Neuronal nuclear antigen (NeuN): A useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death." *J. Neurol Sci.*, 329(1-2), 45-50.
- Lee, E. W., Seo, J., Jeong, M., Lee, S., Song, J. (2012). "The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis." *BMB. Rep.*, 45(9), 496-508.
- Leigh, P. N., Meldrum, B. S. (1996). "Excitotoxicity in ALS." *Neurology*, 47(6 Suppl 4), S221-S227.
- Leroy, K., Brion, J. P. (1999). "Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 β in rat brain." *J. Chem. Neuroanat.*, 16(4), 279-293.
- Lezi, E., Swerdlow, R. H. (2012). "Mitochondria in neurodegeneration." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 942, 269-286.
- Li, L., Zhang, X., Le, W. (2008). "Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice." *Autophagy*, 4(3), 290-293.
- Lillo, P., Mioshi, E., Burrell, J. R., Kiernan, M. C., Hodges, J. R., Hornberger, M. (2012). "Grey and White Matter Changes across the Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia Continuum." *PLoS. One.*, 7(8), e43993.
- Lindstrom, H., Luthman, J., Mouton, P., Spencer, P., Olson, L. (1990). "Plant-derived neurotoxic amino acids (beta-N-oxalylamino-L-alanine and beta-N-methylamino-L-alanine): effects on central monoamine neurons." *J. Neurochem.*, 55(3), 941-949.
- Lipton, S. A. (2004). "Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults." *NeuroRx*, 1(1), 101-110.

- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y. J., Vanderweyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L., Wolozin, B. (2010). "Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue." *PLoS. One.*, 5(10), e13250.
- Liu, H., Wang, H., Shenvi, S., Hagen, T. M., Liu, R. M. (2004). "Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease." *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1019, 346-349.
- Liu, X., Rush, T., Zapata, J., Lobner, D. (2009). "beta-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(-)." *Exp. Neurol.*, 217(2), 429-433.
- Liu, X. Q., Rush, T., Ciske, J., Lobner, D. (2010). "Selective death of cholinergic neurons induced by beta-methylamino-L-alanine." *Neuroreport.*, 21(1), 55-58.
- Lobner, D., Piana, P. M., Salous, A. K., Peoples, R. W. (2007). "Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms." *Neurobiol. Dis.*, 25(2), 360-366.
- Lobner, D. (2009). "Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:56-60., 56-60.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.*, 193(1), 265-275.
- Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R., Avila, J. (2001). "Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice." *EMBO J.*, 20(1-2), 27-39.
- Maag, R. S., Hicks, S. W., Machamer, C. E. (2003). "Death from within: apoptosis and the secretory pathway." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15(4), 456-461.
- Mackenzie, I. R., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., Kwong, L. K., Forman, M. S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretzschmar, H. A., Monoranu, C. M., Highley, J. R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P. J., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. (2007). "Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations." *Ann. Neurol.*, 61(5), 427-434.

- Maiti, S., Chatterjee, A. K. (2000). "Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency." *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 8(4), 227-235.
- Malessa, S., Leigh, P. N., Bertel, O., Sluga, E., Hornykiewicz, O. (1991). "Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord." *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry*, 54(11), 984-988.
- Manzoni, O. J., Prezeau, L., Bockaert, J. (1991). "beta-N-methylamino-L-alanine is a low-affinity agonist of metabotropic glutamate receptors." *Neuroreport*, 2(10), 609-611.
- Martin, L. J. (1999). "Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism." *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 58(5), 459-471.
- Martin, L. J. (2010). "The mitochondrial permeability transition pore: a molecular target for amyotrophic lateral sclerosis therapy." *Biochim. Biophys. Acta*, 1802(1), 186-197.
- Martin, L. J., Chang, Q. (2012). "Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis." *Mol. Neurobiol.*, 45(1), 30-42.
- Martin, W. R. (2007). "MR spectroscopy in neurodegenerative disease." *Mol. Imaging Biol.*, 9(4), 196-203.
- Martinez, A., Gil, C., Perez, D. I. (2011). "Glycogen synthase kinase 3 inhibitors in the next horizon for Alzheimer's disease treatment." *Int. J. Alzheimers. Dis.*, 2011, 280502.
- Mash, D., Pablo, J., Banack, S., Cox, P. A., Johnson, T. E., Papapetropoulos, S., Bradley, W. (2008). "Cyanobacterial toxin BMAA in neurodegeneration." *Amyotroph. Lateral Scler.*, 9(Suppl 1), 89-90.
- Matsuoka, Y., Rakonczay, Z., Giacobini, E., Naritoku, D. (1993). "L-beta-methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats." *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44(3), 727-734.
- Matus, S., Valenzuela, V., Medinas, D. B., Hetz, C. (2013). "ER Dysfunction and Protein Folding Stress in ALS." *Int. J. Cell Biol.*, 2013, 674751.

- Mayne, S. T. (2003). "Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research." *J. Nutr.*, 133 Suppl 3, 933S-940S.
- Menzie, J., Pan, C., Prentice, H., Wu, J. Y. (2014). "Taurine and central nervous system disorders." *Amino. Acids*, 46(1), 31-46.
- Menzies, F. M., Ince, P. G., Shaw, P. J. (2002). "Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurochem. Int.*, 40(6), 543-551.
- Metcalf, J. S., Banack, S. A., Lindsay, J., Morrison, L. F., Cox, P. A., Codd, G. A. (2008). "Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004." *Environ. Microbiol.*, 10(3), 702-708.
- Metcalf, J. S., Codd, G. A. (2009). "Cyanobacteria, neurotoxins and water resources: are there implications for human neurodegenerative disease?" *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:74-8., 74-78.
- Mezzapesa, D. M., Ceccarelli, A., Dicuonzo, F., Carella, A., De Caro, M. F., Lopez, M., Samarelli, V., Livrea, P., Simone, I. L. (2007). "Whole-brain and regional brain atrophy in amyotrophic lateral sclerosis." *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 28(2), 255-259.
- Mezzapesa, D. M., D'Errico, E., Tortelli, R., Distaso, E., Cortese, R., Tursi, M., Federico, F., Zoccolella, S., Logroscino, G., Dicuonzo, F., Simone, I. L. (2013). "Cortical thinning and clinical heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis." *PLoS. One.*, 8(11), e80748.
- Miana-Mena, F. J., González-Mingot, C., Larrode, P., Muñoz, M. J., Olivan, S., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., Reiter, R. J., Osta, R., García, J. J. (2011). "Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neurol.*, 258(5), 762-769.
- Miguel, B. G., Calcerrada, M. C., Catalán, R. E., Martínez, A. M. (2001). "Sphingolipid derivatives modulate intracellular Ca²⁺ in rat synaptosomes." *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*, 61(2), 113-117.
- Miller, A. J. (1982). "Deglutition." *Physiol Rev.*, 62(1), 129-184.

- Mines, M. A., Beurel, E., Jope, R. S. (2011). "Regulation of cell survival mechanisms in Alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3." *Int. J. Alzheimers. Dis.*, 2011, 861072.
- Mitchell, J. D., Borasio, G. D. (2007). "Amyotrophic lateral sclerosis." *Lancet*, 369(9578), 2031-2041.
- Mitsumoto, H., Ulug, A. M., Pullman, S. L., Gooch, C. L., Chan, S., Tang, M. X., Mao, X., Hays, A. P., Floyd, A. G., Battista, V., Montes, J., Hayes, S., Dashnaw, S., Kaufmann, P., Gordon, P. H., Hirsch, J., Levin, B., Rowland, L. P., Shungu, D. C. (2007). "Quantitative objective markers for upper and lower motor neuron dysfunction in ALS." *Neurology*, 68(17), 1402-1410.
- Mondo, K., Hammerschlag, N., Basile, M., Pablo, J., Banack, S. A., Mash, D. C. (2012). "Cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins." *Mar. Drugs*, 10(2), 509-520.
- Montine, T. J., Li, K., Perl, D. P., Galasko, D. (2005). "Lack of beta-methylamino-L-alanine in brain from controls, AD, or Chamorro's with PDC." *Neurology.*, 65(5), 768-769.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." *Neuron*, 12(3), 529-540.
- Morales-García, J. A., Luna-Medina, R., Alonso-Gil, S., Sanz-Sancristobal, M., Palomo, V., Gil, C., Santos, A., Martínez, A., Pérez-Castillo, A. (2012). "Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo." *ACS Chem. Neurosci.*, 3(11), 963-971.
- Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., Abe, K. (2007). "Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene." *Brain Res.*, 1167, 112-117.
- Moser, J. M., Bigini, P., Schmitt-John, T. (2013). "The wobbler mouse, an ALS animal model." *Mol. Genet. Genomics*, 288(5-6), 207-229.
- Moujalled, D., James, J. L., Parker, S. J., Lidgerwood, G. E., Duncan, C., Meyerowitz, J., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kanninen, K. M., Grubman, A., Liddell, J. R., Crouch, P. J., White, A. R. (2013). "Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-

- Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress." *PLoS. One.*, 8(6), e67433.
- Mulder, D. W., Kurland, L. T., Offord, K. P., Beard, C. M. (1986). "Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology*, 36(4), 511-517.
- Mulder, D. W., Kurland, L. T. (1987). "Motor neuron disease: epidemiologic studies." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 209, 325-332.
- Muñoz-Sáez, E., de Munck, E., Arahuetes, R. M., Solas, M. T., Martínez, A. M., Miguel, B. G. (2013). "beta-N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma." *J. Toxicol. Sci.*, 38(3), 425-430.
- Murch, S. J., Cox, P. A., Banack, S. A. (2004). "A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(33), 12228-12231.
- Murphy, T. H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R. L., Coyle, J. T. (1989). "Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress." *Neuron*, 2(6), 1547-1558.
- Murphy, T. H., Schnaar, R. L., Coyle, J. T. (1990). "Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake." *FASEB J.*, 4(6), 1624-1633.
- Myers, T. G., Nelson, S. D. (1990). "Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by ¹³C NMR." *J. Biol. Chem.*, 265(18), 10193-10195.
- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R. H., Jr., Itoyama, Y. (2001). "Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease." *J. Neurosci.*, 21(23), 9246-9254.
- Naor, S., Keren, Z., Bronshtein, T., Goren, E., Machluf, M., Melamed, D. (2009). "Development of ALS-like disease in SOD-1 mice deficient of B lymphocytes." *J. Neurol*, 256(8), 1228-1235.
- Nassif, M., Matus, S., Castillo, K., Hetz, C. (2010). "Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway." *Antioxid. Redox. Signal.*, 13(12), 1955-1989.

- Nassif, M., Hetz, C. (2011). "Targeting autophagy in ALS: a complex mission." *Autophagy*, 7(4), 450-453.
- Neumann, M., Kwong, L. K., Lee, E. B., Kremmer, E., Flatley, A., Xu, Y., Forman, M. S., Troost, D., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2009). "Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies." *Acta Neuropathol.*, 117(2), 137-149.
- Niebroj-Dobosz, I., Janik, P. (1999). "Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." *Acta Neurol Scand*, 100(1), 6-11.
- Niebroj-Dobosz, I., Rafalowska, J., Fidzianska, A., Gadamski, R., Grieb, P. (2007). "Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats." *Folia Neuropathol.*, 45(4), 236-241.
- Niessen, H. G., Angenstein, F., Sander, K., Kunz, W. S., Teuchert, M., Ludolph, A. C., Heinze, H. J., Scheich, H., Vielhaber, S. (2006). "In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient." *Exp. Neurol.*, 201(2), 293-300.
- Nieto-González, J. L., Moser, J., Lauritzen, M., Schmitt-John, T., Jensen, K. (2011). "Reduced GABAergic inhibition explains cortical hyperexcitability in the wobbler mouse model of ALS." *Cereb. Cortex*, 21(3), 625-635.
- Nihei, K., McKee, A. C., Kowall, N. W. (1993). "Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients." *Acta Neuropathol.*, 86(1), 55-64.
- Nijholt, D. A., De Kimpe, L., Elfrink, H. L., Hoozemans, J. J., Scheper, W. (2011). "Removing protein aggregates: the role of proteolysis in neurodegeneration." *Curr. Med. Chem.*, 18(16), 2459-2476.
- Nishihira, Y., Tan, C. F., Onodera, O., Toyoshima, Y., Yamada, M., Morita, T., Nishizawa, M., Kakita, A., Takahashi, H. (2008). "Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions." *Acta Neuropathol.*, 116(2), 169-182.

- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H. (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." *Genes Dev.*, 16(11), 1345-1355.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H. (2008). "ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1." *Genes Dev.*, 22(11), 1451-1464.
- Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H., Hasegawa, M. (2009). "Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43." *Hum. Mol. Genet.*, 18(18), 3353-3364.
- Nunn, P. B., Seelig, M., Zagoren, J. C., Spencer, P. S. (1987). "Stereospecific acute neuronotoxicity of 'uncommon' plant amino acids linked to human motor-system diseases." *Brain Res.*, 410(2), 375-379.
- Nunn, P. B., O'Brien, P., Pettit, L. D., Pyburn, S. I. (1989). "Complexes of zinc, copper, and nickel with the nonprotein amino acid L-alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid: a naturally occurring neurotoxin." *J. Inorg. Biochem.*, 37(2), 175-183.
- Nunn, P. B., Ponnusamy, M. (2009). "Beta-N-methylaminoalanine (BMAA): metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat in vitro." *Toxicol.*, 54(2), 85-94.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." *Anal. Biochem.*, 95(2), 351-358.
- Okamoto, K., Fujita, Y., Mizuno, Y. (2010). "Pathology of protein synthesis and degradation systems in ALS." *Neuropathology.*, 30(2), 189-193.
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., Dietrich, D. R. (2012). "L-BMAA induced ER-stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low non-excitotoxic concentrations." *Toxicol. Sci.*, 131(1), 217-224.
- Okle, O., Rath, L., Galizia, C. G., Dietrich, D. R. (2013). "The cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) induces neuronal and behavioral changes in honeybees." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 270(1), 9-15.

- Oppenheim, R. W. (1996). "Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches." *Neuron*, 17(2), 195-197.
- Oyadomari, S., Mori, M. (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." *Cell Death. Differ.*, 11(4), 381-389.
- Oyanagi, K., Yamazaki, M., Takahashi, H., Watabe, K., Wada, M., Komori, T., Morita, T., Mizutani, T. (2008). "Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum." *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 34(6), 650-658.
- Pablo, J., Banack, S. A., Cox, P. A., Johnson, T. E., Papapetropoulos, S., Bradley, W. G., Buck, A., Mash, D. C. (2009). "Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease." *Acta Neurol. Scand.*, 120(4), 216-225.
- Pai, K. S., Shankar, S. K., Ravindranath, V. (1993). "Billion-fold difference in the toxic potencies of two excitatory plant amino acids, L-BOAA and L-BMAA: biochemical and morphological studies using mouse brain slices." *Neurosci. Res.*, 17(3), 241-248.
- Palomo, V., Pérez, D. I., Gil, C., Martínez, A. (2011). "The potential role of glycogen synthase kinase 3 inhibitors as amyotrophic lateral sclerosis pharmacological therapy." *Curr. Med. Chem.*, 18(20), 3028-3034.
- Pap, M., Cooper, G. M. (1998). "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway." *J. Biol. Chem.*, 273(32), 19929-19932.
- Papapetropoulos, S. (2007). "Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm." *Neurochem. Int.*, 50(7-8), 998-1003.
- Paxinos, G., Watson, C. (2005). "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th edition." Ed. Elsevier Academic Press.
- Perry, T. L., Hansen, S., Jones, K. (1987). "Brain glutamate deficiency in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology*, 37(12), 1845-1848.
- Perry, T. L., Bergeron, C., Biro, A. J., Hansen, S. (1989). "Beta-N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice." *J. Neurol Sci.*, 94(1-3), 173-180.

- Petri, S., Kollwe, K., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., Bufler, J., Krampfl, K. (2006). "GABA(A)-receptor mRNA expression in the prefrontal and temporal cortex of ALS patients." *J. Neurol Sci.*, 250(1-2), 124-132.
- Philips, T., Bento-Abreu, A., Nonneman, A., Haeck, W., Staats, K., Geelen, V., Hersmus, N., Kusters, B., Van Den, B. L., Van Damme, P., Richardson, W. D., Robberecht, W. (2013). "Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." *Brain*, 136(Pt 2), 471-482.
- Pohl, C., Block, W., Karitzky, J., Traber, F., Schmidt, S., Grothe, C., Lamerichs, R., Schild, H., Klockgether, T. (2001). "Proton magnetic resonance spectroscopy of the motor cortex in 70 patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Arch. Neurol.*, 58(5), 729-735.
- Polsky, F. I., Nunn, P. B., Bell, E. A. (1972). "Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid." *Fed. Proc.*, 31(5), 1473-1475.
- Provenzale, J. (2004). "Dementias and degenerative disorders." *Diagnostic Imaging Brain*. 1ª ed. Salt Lake City: Amirsys, 86-89.
- Purdie, E. L., Metcalf, J. S., Kashmiri, S., Codd, G. A. (2009). "Toxicity of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine to three aquatic animal species." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:67-70., 67-70.
- Pyra, T., Hui, B., Hanstock, C., Concha, L., Wong, J. C., Beaulieu, C., Johnston, W., Kalra, S. (2010). "Combined structural and neurochemical evaluation of the corticospinal tract in amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph. Lateral Scler.*, 11(1-2), 157-165.
- Rakonczay, Z., Matsuoka, Y., Giacobini, E. (1991). "Effects of L-beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat." *J. Neurosci. Res.*, 29(1), 121-126.
- Rao, R. V., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. (2004). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program." *Cell Death. Differ.*, 11(4), 372-380.
- Rao, S. D., Banack, S. A., Cox, P. A., Weiss, J. H. (2006). "BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation." *Exp. Neurol.*, 201(1), 244-252.
- Rebolledo F.A. (2005). "Alimentación y deglución. Aspectos relacionados con el desarrollo normal." *Plast & Rest Neurol*, 4(1-2), 49-57.

- Reece, D. M., Nunn, P. B. (1989). "Synthesis of ¹⁴C-labelled l-alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid and its metabolism in the rat." *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 203-204.
- Reiner, A., Medina, L., Figueredo-Cardenas, G., Anfinson, S. (1995). "Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS." *Exp. Neurol*, 131(2), 239-250.
- Reyes, N. A., Fisher, J. K., Austgen, K., Vandenberg, S., Huang, E. J., Oakes, S. A. (2010). "Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *J. Clin. Invest*, 120(10), 3673-3679.
- Ro, L. S., Lai, S. L., Chen, C. M., Chen, S. T. (2003). "Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hospital-based case-control study." *Muscle Nerve*, 28(6), 737-743.
- Robberecht, W. (2000). "Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neurol.*, 247(Suppl 1), 1-6.
- Robberecht, W., Philips, T. (2013). "The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis." *Nat. Rev. Neurosci.*, 14(4), 248-264.
- Robertson, J., Beaulieu, J. M., Doroudchi, M. M., Durham, H. D., Julien, J. P., Mushynski, W. E. (2001). "Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha." *J. Cell Biol.*, 155(2), 217-226.
- Rodgers, K., Dunlop, R. (2011). "The cyanobacteria-derived BMAA can be incorporated into cell proteins and could thus be an environmental trigger for ALS and other neurological diseases associated with protein misfolding." *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 12(Suppl. 1), 22.
- Rodgers, K. J. (2014). "Non-protein amino acids and neurodegeneration: The enemy within." *Exp. Neurol*, 253C, 192-196.
- Rooney, W. D., Miller, R. G., Gelinas, D., Schuff, N., Maudsley, A. A., Weiner, M. W. (1998). "Decreased N-acetylaspartate in motor cortex and corticospinal tract in ALS." *Neurology*, 50(6), 1800-1805.

- Ross, S. M., Seelig, M., Spencer, P. S. (1987). "Specific antagonism of excitotoxic action of 'uncommon' amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures." *Brain Res.*, 425(1), 120-127.
- Ross, S. M., Spencer, P. S. (1987). "Specific antagonism of behavioral action of "uncommon" amino acids linked to motor-system diseases." *Synapse*, 1(3), 248-253.
- Rothstein, J. D., Tsai, G., Kuncl, R. W., Clawson, L., Cornblath, D. R., Drachman, D. B., Pestronk, A., Stauch, B. L., Coyle, J. T. (1990). "Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann. Neurol*, 28(1), 18-25.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., Kuncl, R. W. (1995). "Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann. Neurol*, 38(1), 73-84.
- Rubio, I., Rodríguez-Navarro, J. A., Tomas-Zapico, C., Ruiz, C., Casarejos, M. J., Perucho, J., Gomez, A., Rodal, I., Lucas, J. J., Mena, M. A., de Yébenes, J. G. (2009). "Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice." *Brain Res.*, 1281, 91-100.
- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., Arias, C. (2011). "GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration." *Int. J. Alzheimers. Dis.*, 2011, 189728.
- Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., Hell, J. W., Wenthold, R. J. (2000). "A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses." *J. Neurosci.*, 20(3), 1260-1271.
- Santiago, M., Matarredona, E. R., Machado, A., Cano, J. (2006). "Acute perfusion of BMAA in the rat's striatum by in vivo microdialysis." *Toxicol. Lett.*, 167(1), 34-39.
- Santucci, S., Zsurgar, N., Chabry, J. (2009). "beta-N-methylamino-L-alanine induced in vivo retinal cell death." *J. Neurochem.*, 109(3), 819-825.
- Sasaki, S., Iwata, M. (1999). "Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Neurosci. Lett.*, 268(1), 29-32.
- Sasaki, S., Iwata, M. (2007). "Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66(1), 10-16.

- Sasaki, S. (2010). "Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 69(4), 346-355.
- Sasaki, S. (2011). "Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 70(5), 349-359.
- Seawright, A. A., Brown, A. W., Nolan, C. C., Cavanagh, J. B. (1990). "Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-beta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats." *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 16(2), 153-169.
- Sekizawa, T., Openshaw, H., Ohbo, K., Sugamura, K., Itoyama, Y., Niland, J. C. (1998). "Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases." *J. Neurol Sci.*, 154(2), 194-199.
- Shaw, P. J., Forrest, V., Ince, P. G., Richardson, J. P., Wastell, H. J. (1995). "CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients." *Neurodegeneration.*, 4(2), 209-216.
- Shaw, P. J. (2005). "Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease." *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry*, 76(8), 1046-1057.
- Shi, P., Gal, J., Kwinter, D. M., Liu, X., Zhu, H. (2010). "Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis." *Biochim. Biophys. Acta.*, 1802(1), 45-51.
- Shi, P., Wei, Y., Zhang, J., Gal, J., Zhu, H. (2010). "Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Alzheimers. Dis.*, 20 Suppl 2:S311-24., S311-S324.
- Sica, R. E., Nicola, A. F., Deniselle, M. C., Rodríguez, G., Monachelli, G. M., Peralta, L. M., Bettini, M. (2011). "Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: new hypothesis regarding its etiology and pathogenesis suggests that astrocytes might be the primary target hosting a still unknown external agent." *Arq Neuropsiquiatr.*, 69(4), 699-706.
- Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R. G., Joo, F., Appel, S. H. (1996). "Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann. Neurol*, 39(2), 203-216.

- Sinha, S., Mallick, S., Misra, R. K., Singh, S., Basant, A., Gupta, A. K. (2007). "Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants." *Chemosphere*, 67(1), 176-187.
- Smith, Q. R., Nagura, H., Takada, Y., Duncan, M. W. (1992). "Facilitated transport of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine, across the blood-brain barrier." *J. Neurochem.*, 58(4), 1330-1337.
- Smith, Q. R. (2000). "Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier." *J. Nutr.*, 130(4S Suppl), 1016S-1022S.
- Smith, S. E., Meldrum, B. S. (1990). "Receptor site specificity for the acute effects of beta-N-methylamino-alanine in mice." *Eur. J. Pharmacol.*, 187(1), 131-134.
- Snyder, L. R., Cruz-Aguado, R., Sadilek, M., Galasko, D., Shaw, C. A., Montine, T. J. (2009). "Parkinson-dementia complex and development of a new stable isotope dilution assay for BMAA detection in tissue." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 240(2), 180-188.
- Spácil, Z., Eriksson, J., Jonasson, S., Rasmussen, U., Ilag, L. L., Bergman, B. (2010). "Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples." *Analyst.*, 135(1), 127-132.
- Spencer, P. S., Hugon, J., Ludolph, A., Nunn, P. B., Ross, S. M., Roy, D. N., Schaumburg, H. H. (1987). "Discovery and partial characterization of primate motor-system toxins." *Ciba Found. Symp.*, 126, 221-238.
- Spencer, P. S., Nunn, P. B., Hugon, J., Ludolph, A. C., Ross, S. M., Roy, D. N., Robertson, R. C. (1987). "Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin." *Science*, 237(4814), 517-522.
- Spencer, P. S., Kisby, G. E., Ludolph, A. C. (1991). "Slow toxins, biologic markers, and long-latency neurodegenerative disease in the western Pacific region." *Neurology*, 41(5 Suppl 2), 62-66.
- Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P. F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., Meininger, V. (2002). "Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients." *J. Neurol Sci.*, 193(2), 73-78.

- Staton, P. C., Bristow, D. R. (1998). "Role of group III metabotropic glutamate receptors in excitotoxin-induced cerebellar granule cell death." *J. Neurochem.*, 71(3), 1280-1288.
- Strasser, U., Lobner, D., Behrens, M. M., Canzoniero, L. M., Choi, D. W. (1998). "Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures." *Eur. J. Neurosci.*, 10(9), 2848-2855.
- Strong, M. J. (2010). "The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." *J. Neurol Sci.*, 288(1-2), 1-12.
- Sumi, H., Kato, S., Mochimaru, Y., Fujimura, H., Etoh, M., Sakoda, S. (2009). "Nuclear TAR DNA binding protein 43 expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68(1), 37-47.
- Sutherland, C., Leighton, I. A., Cohen, P. (1993). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling." *Biochem. J.*, 296 (Pt 1), 15-19.
- Teijón, C., Olmo, R., Blanco, D., Romero, A., Teijón, J. M. (2006). "Low doses of lead: effects on reproduction and development in rats." *Biol. Trace Elem. Res.*, 111(1-3), 151-165.
- Tooze, S. A., Schiavo, G. (2008). "Liaisons dangereuses: autophagy, neuronal survival and neurodegeneration." *Curr. Opin. Neurobiol.*, 18(5), 504-515.
- Trinder, P. (1969). "Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen." *J. Clin. Pathol.*, 22(2), 158-161.
- Troost, D., van den Oord, J. J., de Jong, J. M., Swaab, D. F. (1989). "Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Clin. Neuropathol.*, 8(6), 289-294.
- Troost, D., van den Oord, J. J., Vianney de Jong, J. M. (1990). "Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis." *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 16(5), 401-410.
- Turner, B. J., Talbot, K. (2008). "Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS." *Prog. Neurobiol.*, 85(1), 94-134.
- Turner, M. R., Cagnin, A., Turkheimer, F. E., Miller, C. C., Shaw, C. E., Brooks, D. J., Leigh, P. N., Banati, R. B. (2004). "Evidence of widespread cerebral microglial

- activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study." *Neurobiol. Dis.*, 15(3), 601-609.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39(1), 44-84.
- Valvezan, A. J., Klein, P. S. (2012). "GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder." *Front Mol. Neurosci.*, 5, 1.
- van Welsem, M. E., Hogenhuis, J. A., Meininger, V., Metsaars, W. P., Hauw, J. J., Seilhean, D. (2002). "The relationship between Bunina bodies, skein-like inclusions and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Neuropathol.*, 103(6), 583-589.
- Vega, A., Bell, E. A. (1967). "Alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*." *Phytochemistry*, 6, 759-762.
- Vega, A., Bell, E. A., Nunn, P. B. (1968). "The preparation of L- and D- alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid and the identification of the compound isolated from *Cycas circinalis* as the L-isomer." *Phytochemistry*, 7, 1885-1887.
- Verstraete, E., van den Heuvel, M. P., Veldink, J. H., Blanken, N., Mandl, R. C., Hulshoff Pol, H. E., van den Berg, L. H. (2010). "Motor network degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: a structural and functional connectivity study." *PLoS. One.*, 5(10), e13664.
- Vijayalakshmi, K., Alladi, P. A., Ghosh, S., Prasanna, V. K., Sagar, B. C., Nalini, A., Sathyaprabha, T. N., Raju, T. R. (2011). "Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients." *Neurobiol. Dis.*, 41(3), 695-705.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., Valavanidis, A. (2007). "Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece." *Mar. Pollut. Bull.*, 54(9), 1361-1371.
- Vucic, S., Cheah, B. C., Kiernan, M. C. (2009). "Defining the mechanisms that underlie cortical hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis." *Exp. Neurol*, 220(1), 177-182.

- Vukosavic, S., Dubois-Dauphin, M., Romero, N., Przedborski, S. (1999). "Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neurochem.*, 73(6), 2460-2468.
- Walker, A. K., Atkin, J. D. (2011). "Stress signaling from the endoplasmic reticulum: A central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." *IUBMB. Life*, 63(9), 754-763.
- Walker, L. C., LeVine, H. (2000). "The cerebral proteopathies: neurodegenerative disorders of protein conformation and assembly." *Mol. Neurobiol.*, 21(1-2), 83-95.
- Weiss, J. H., Choi, D. W. (1988). "Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor." *Science*, 241(4868), 973-975.
- Weiss, J. H., Christine, C. W., Choi, D. W. (1989 a). "Bicarbonate dependence of glutamate receptor activation by beta-N-methylamino-L-alanine: channel recording and study with related compounds." *Neuron*, 3(3), 321-326.
- Weiss, J. H., Koh, J. Y., Choi, D. W. (1989 b). "Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and beta-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons." *Brain Res.*, 497(1), 64-71.
- Weiss, J. H., Sensi, S. L. (2000). "Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration." *Trends Neurosci.*, 23(8), 365-371.
- Weydt, P., Weiss, M. D., Moller, T., Carter, G. T. (2002). "Neuro-inflammation as a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis." *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 3(12), 1720-1724.
- Whiting, M. G. (1988). "Toxicity of cycads: implications for neurodegenerative diseases and cancer. Transcripts of Four Cycad Conferences. The Fifth Cycad Conference. 1967." Third World Medical Research Foundation, New York, XI-1.-XI-7.
- Wiedemann, F. R., Winkler, K., Kuznetsov, A. V., Bartels, C., Vielhaber, S., Feistner, H., Kunz, W. S. (1998). "Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neurol Sci.*, 156(1), 65-72.
- Wijesekera, L. C., Leigh, P. N. (2009). "Amyotrophic lateral sclerosis." *Orphanet. J. Rare Dis.*, 4:3, 3.

- Williamson, T. L., Cleveland, D. W. (1999). "Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons." *Nat. Neurosci.*, 2(1), 50-56.
- Wilms, H., Sievers, J., Dengler, R., Bufler, J., Deuschl, G., Lucius, R. (2003). "Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration." *J. Neuroimmunol.*, 144(1-2), 139-142.
- Wu, J. Y., Prentice, H. (2010). "Role of taurine in the central nervous system." *J. Biomed. Sci.*, 17 Suppl 1:S1.
- Xie, X., Basile, M., Mash, D. C. (2013). "Cerebral uptake and protein incorporation of cyanobacterial toxin beta-N-methylamino-L-alanine." *Neuroreport*, 24(14), 779-784.
- Xu, G. P., Dave, K. R., Vivero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T. J., Pérez-Pinzón, M. A. (2002). "Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures." *Brain Res.*, 952(2), 153-158.
- Xu, Z., Jung, C., Higgins, C., Levine, J., Kong, J. (2004). "Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis." *J. Bioenerg. Biomembr.*, 36(4), 395-399.
- Yamamuro, A., Kishino, T., Ohshima, Y., Yoshioka, Y., Kimura, T., Kasai, A., Maeda, S. (2011). "Caspase-4 directly activates caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells." *J. Pharmacol. Sci.*, 115(2), 239-243.
- Yang, W., Leystra-Lantz, C., Strong, M. J. (2008). "Upregulation of GSK3beta expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci)." *Brain Res.*, 1196, 131-139.
- Yoo, Y. E., Ko, C. P. (2011). "Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Exp. Neurol.*, 231(1), 147-159.
- Zang, D. W., Yang, Q., Wang, H. X., Egan, G., Lopes, E. C., Cheema, S. S. (2004). "Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Eur. J. Neurosci.*, 20(7), 1745-1751.

- Zeevalk, G. D., Nicklas, W. J. (1989). "Acute excitotoxicity in chick retina caused by the unusual amino acids BOAA and BMAA: effects of MK-801 and kynurenate." *Neurosci. Lett.*, 102(2-3), 284-290.
- Zeevalk, G. D., Razmpour, R., Bernard, L. P. (2008). "Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room?" *Biomed. Pharmacother.*, 62(4), 236-249.
- Zhang, L., Ulug, A. M., Zimmerman, R. D., Lin, M. T., Rubin, M., Beal, M. F. (2003). "The diagnostic utility of FLAIR imaging in clinically verified amyotrophic lateral sclerosis." *J. Magn Reson. Imaging*, 17(5), 521-527.
- Zhang, X., Li, L., Chen, S., Yang, D., Wang, Y., Zhang, X., Wang, Z., Le, W. (2011). "Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Autophagy*, 7(4), 412-425.
- Zhang, Y. J., Xu, Y. F., Dickey, C. A., Buratti, E., Baralle, F., Bailey, R., Pickering-Brown, S., Dickson, D., Petrucelli, L. (2007). "Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43." *J. Neurosci.*, 27(39), 10530-10534.
- Zhang, Y. J., Xu, Y. F., Cook, C., Gendron, T. F., Roettges, P., Link, C. D., Lin, W. L., Tong, J., Castanedes-Casey, M., Ash, P., Gass, J., Rangachari, V., Buratti, E., Baralle, F., Golde, T. E., Dickson, D. W., Petrucelli, L. (2009). "Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(18), 7607-7612.
- Zhou, X., Escala, W., Papapetropoulos, S., Bradley, W. G., Zhai, R. G. (2009). "BMAA neurotoxicity in *Drosophila*." *Amyotroph. Lateral. Scler.*, 10 Suppl 2:61-6., 61-66.
- Zhou, X., Escala, W., Papapetropoulos, S., Zhai, R. G. (2010). "beta-N-Methylamino-L-alanine Induces Neurological Deficits and Shortened Life Span in *Drosophila*." *Toxins. (Basel)*, 2(11), 2663-2679.
- Zimba, P. V., Khoo, L., Gaunt, P. S., Brittain, S., Carmichael, W. W. (2001). "Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins." *J. Fish Dis.*, 24(1), 41-47.
- Zlokovic, B. V. (2005). "Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration." *Trends Neurosci.*, 28(4), 202-208.

PUBLICACIONES RELACIONADAS

COMUNICACIÓN ORAL EN EL CONGRESO INTERNACIONAL “FRONTIERS IN MEDICINAL CHEMISTRY” CELEBRADO EN JUNIO DE 2011, EN ESTOCOLMO, SUECIA.

“Increased motor neuron survival and cellular viability employing protein kinase inhibitors for Amiotrophic Lateral Sclerosis”

Daniel I. Pérez¹, Ernesto Miquel², Begoña G. Miguel³, Valle Palomo¹, Estefanía de Munck⁴, Emma Muñoz⁴, Concepción Pérez¹, Carmen Gil¹, Laura Martinez-Palma², Rosa M. Arahuetes⁴, Ana Pérez-Castillo⁵, Patricia Cassina², Ana Martinez¹.

1-Instituto de Química Médica-CSIC, Madrid, Spain.

2-Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

3-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

4-Departamento de Fisiología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

5-Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Madrid, Spain.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal disorder of motor neuron degeneration from the cortex, brainstem and spinal cord resulting in muscle weakness and atrophy. The progressive degeneration of the motor neurons in ALS eventually leads to their death. Most hypotheses for this selective cell loss have primarily addressed early changes in motor neurons involving oxidative damage, defective cytoskeletal function, protein misfolding and aggregation and excitotoxicity from disruption of extracellular glutamate homeostasis [1].

ALS etiology is unclear. Approximately 10% of ALS cases, termed familial ALS (fALS), have a clear genetic link, while 90% of Sporadic ALS (sALS) represents 90-95% of all ALS cases [2]. For sporadic ALS there is a toxic hypothesis where the -N-methylamino-L-alanine (BMAA) was proposed to contribute to the ALS/Parkinsonism/dementia complex of Guam (ALS/PDC) based on its presence in cycad seeds and because of the exposure from desert dust among Gulf war veterans.

L-BMAA induces progressive motoneuronal damage and symptoms that closely resemble ALS in the cynomolgus monkey and excitotoxic changes in rat and mouse cultured cortical neurons [3].

Due to the fact that there is no effective treatment for ALS the search for new drugs able to modify the course of neurodegeneration of the disease is of utmost importance. Our group has expertise in the design and synthesis of innovative drugs, mainly protein kinase inhibitors for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease [4, 5]. Here we present the results of two of our kinase inhibitors VP-2.51 and DIP-5.5 in cellular cultures exposed to the BMAA toxin, finding an increased cellular viability and motor neuron survival under trophic factor deprivation, together with a protection against inflammatory damage produced by nitrites in astrocytes and microglia. Based on these results we can consider the potential of these two compounds as a possible treatment for ALS.

References

- [1] Barbeito, L. H.; Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas M.R.; Peluffo, H.; Viera, L.; Estevez A.G.; Beckman, J. S. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res. Rev.* 2004, 47, 263– 274.
- [2] Liscic R. M.; Breljak D. Molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* 2011, 35 (2), 370-372.
- [3] Matsuoka, Y.; Rakonczay, Z.; Giacobini, E.; Naritoku, D. L--Methylamino-Alanine induced behavioral changes in rats. *Pharmacology Biochem. Behavior.* 1993, 44, 727-734.
- [4] Pérez, D. I.; Conde, S.; Pérez, C.; Gil, C.; Simon, D.; Wandosell, F., Moreno F. J.; Luque, F. J.; Gelpí, J.L., Martínez, A. Thienylhalomethylketones: Irreversible GSK-3 inhibitors as useful pharmacological tools. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 6914-6925.
- [5] Pérez, D. I.; Palomo, V.; Pérez, C.; Gil, C.; Dans, P. D.; Luque, F. J.; Conde, S.; Martinez, A. Switching reversibility to irreversibility in glycogen synthase kinase 3 inhibitors: clues for specific design of new compounds. *J. Med. Chem.* 2011, doi: 10.1021/jm1016279

PÓSTER EN EL “XXXIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR” CELEBRADO EN SEPTIEMBRE DE 2011, EN BARCELONA.

“Efecto neurotóxico del β -Nmetilamino-L-alanina en cultivos neuronales”

Begoña G. Miguel¹, Rosa M. Arahuetes², Emma Muñoz-Saez¹, Estefanía de Munck², Irene Ojeda² y Ana M. Martínez¹.

1-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

2-Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurológica de causa aún desconocida y evolución clínica muy variable, que se manifiesta con degeneración progresiva de las motoneuronas. Se estima que más del 90% de los afectados padece la forma esporádica de la enfermedad que se presenta con una elevada incidencia entre determinados grupos de la población. El denominador común de todos estos casos parece ser el efecto neurotóxico de un aminoácido el β -N-metilamino-L-alanina (LBMAA). El aminoácido en presencia de bicarbonato genera un aducto carbamylado similar al glutamato, neurotransmisor excitatorio implicado en la patogénesis de la ELA. El LBMAA llega al cerebro a través del transportador de aminoácidos neutros de la barrera hematoencefálica y actúa sobre los receptores glutamatérgicos: AMPA, NMDA y mGluR1 y en mGluR5. El presente estudio está dirigido a conocer la acción del L-BMAA en diferentes parámetros de la actividad neuronal, utilizando cultivos celulares de neuronas SH-SY5Y. Los resultados obtenidos indican, en primer lugar, que el L-BMAA produce un descenso significativo de la viabilidad neuronal, el cual depende de la dosis utilizada. Experimentos llevados a cabo en presencia de inhibidores específicos demuestran la implicación de diferentes isoformas de PKC en la viabilidad de estas neuronas, concretamente las isoformas PKC ζ y PKC δ fundamentalmente. Asimismo, se pudo concluir que el tratamiento con L-BMAA da lugar también a un importante incremento en la producción de ROS y de calcio citosólico. También se ha detectado despolarización de la membrana mitocondrial y variación de los niveles de calcio intramitocondriales. Estos efectos son compatibles con las disfunciones que se detectan en los enfermos de ELA y pueden representar un punto de partida para validar un modelo de estudio de la enfermedad.

PÓSTER EN EL "6TH EUROPEAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY" CELEBRADO EN JULIO DE 2012, EN GRANADA.

"Effect of β -N-methylamino-L-alanine on oxidative stress of liver and kidney in rat"

Estefanía de Munck ¹, Emma Muñoz ¹, María Teresa Antonio ¹, Javier Pineda ¹, Amparo Herrera ¹, Begoña G. Miguel ², Rosa María Arahuetes ¹.

1-Universidad Complutense de Madrid, Fisiología Animal II, 28040, Spain.

2-Universidad Complutense de Madrid, Bioquímica y Biología Molecular I, 28040, Spain.

The relationship between β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) and high rates of amyotrophic lateral sclerosis/Parkinson's disease complex (ALS/PDC) was first identified in the island of Guam. This neurotoxin is a naturally occurring, non-protein amino acid found in the majority of cyanobacterial genera tested. Evidence for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders relies on its bioaccumulation and biomagnification through food chain. Uptake and accumulation of free L-BMAA by various non-symbiotic organisms, including aquatic macrophytes, has been documented but to date only a few ecotoxicological investigations have been published. The involvement of L-BMAA in oxidative stress has been demonstrated in several studies in the central nervous system of animals treated with this neurotoxin. In the present study, we investigate the effect of L-BMAA xenobiotic agent on the oxidative stress responses of liver and kidney in rats treated by intraperitoneal administration of 6 consecutive doses of L-BMAA (250 mg/kg). All experiments were performed in rats *Rattus norvegicus*, albinus variety, which were provided by Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain). Control and treated groups were composed by 10 male rats and 10 female rats each one. Oxidative stress is demonstrated by the quantification of lipid peroxidation expressed in the production of thiobarbituric-malondialdehyde complex, the measurement of catalase and glutathione peroxidase activities, as well as the quantification of glutathione (GSH) levels and the total antioxidant capacity. We observed that L-BMAA caused a significant increase in the degree of lipid peroxidation and catalase activity in both organs. A significant increase in glutathione peroxidase activity was only obtained in liver, whereas glutathione levels were also increased in both organs. The total antioxidant capacity decreased in liver and increased in kidney. Our results show that L-BMAA administration produces

oxidative damage in liver and kidneys, as strongly suggested by the significant increase of TBARS and the high catalase activity. In addition, the liver seems to be more susceptible to the L-BMAA toxic action than the kidneys, perhaps due to detoxification processes. Finally, given the evidences for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders like ALS, these results may be useful for future studies with L-BMAA treated rats. Our study suggests that oxidative stress generated by the administration of this substance in liver and kidney, although significant, is not enough to affect the functionality of the first one, which facilitates its use in experimental animals to contribute to the clarification of the pathogenesis of this disease. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether significant differences existed between control and treated groups. The male and female data were analysed individually. The differences between means were tested by Bonferroni's multiple range tests. A value of $p < 0.05$ was chosen as the minimal level of statistical significance.

PÓSTER EN EL “22ND IUBMB AND 37TH FEBS CONGRESS” CELEBRADO EN SEPTIEMBRE DE 2012, EN SEVILLA.

“Action of β -N-methylamino-L-alanine on both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma”

Emma Muñoz¹, Estefanía de Munck², Rosa M. Arahuetes², Ana M. Martínez¹, Begoña G. Miguel¹.

1-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

2-Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid that has been related to various neurodegenerative diseases. Taking into account that both glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43) have been described as possible neurodegenerative disease hallmarks, the main goal of this study was analyze whether the treatment with L-BMAA produces alterations in both biomarker proteins. The experiments were performed in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. In all experiments, cells were incubated for 24 hour with 10 mM L-BMAA. Western blots showed a discrete increase in GSK3 α/β in cellular total extracts. When the nuclear fraction was analyzed, a significant increase in GSK3 β was observed, without appreciates any decline in the levels of these proteins in the cytosol. GSK3 β has been established as an antiapoptotic regulator of death receptor-induced extrinsic apoptosis, but this protective action occurs when GSK3 β is located in the cytosol. Under basal conditions, GSK3 β is mostly cytosolic and associated with multiprotein complexes, which are their substrates. After stimulation, GSK3 β is released from protein anchors and it is translocated to nucleus, where it is highly active and has been involved in important cellular functions achieved by GSK3 phosphorylation of numerous transcription factors and produces cellular death. Therefore, our results indicate that the toxicity of LBMAA implies both an increase of GSK3 β synthesis and a GSK3 β translocation to the nucleus, as part of its action producing cell death. Our results also indicated that L-BMAA cause an increase in TDP-43 and alterations in its structure, giving rise to the formation of aggregates of TDP-43 without nuclear TDP-43 depletion. This study demonstrated that L-BMAA leads the increase of GSK3 and TDP-43, two possible biomarkers for neurodegenerative diseases.

PÓSTER EN EL “XXXVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR” CELEBRADO EN SEPTIEMBRE DE 2013, EN MADRID.

“ β -N-methylamino-L-alanine causa la formación de agregados patológicos de TDP-43 en un modelo animal de esclerosis lateral Amiotrófica”

Emma Muñoz-Saez¹, Estefanía de Munck², Rosa M. Arahuetes², Ana M. Martínez¹, Begoña G. Miguel¹.

1-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

2-Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

El β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) es un aminoácido neurotóxico que ha sido relacionado con algunas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio, basados en el tratamiento con L-BMAA, han dado lugar al diseño de un modelo animal de ELA esporádica que ha sido objeto de una patente.

Por otro lado, hay que destacar que (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43), es un factor de transcripción relacionado con patologías neurodegenerativas. En condiciones normales esta proteína está localizada en el núcleo, con escasa presencia en el citosol. Los enfermos de ELA presentan, en el citosol celular, agregados patológicos de esta proteína que son tau negativos y ubiquitina positivos, lo cual podría indicar que TDP-43 pueda considerarse como un biomarcador de la enfermedad.

El presente estudio se ha llevado a cabo en ratas tratadas intraperitonealmente con LBMAA durante 5 días consecutivos, tiempo suficiente para provocar en los animales alteraciones neurológicas significativas, compatibles con las observadas en enfermos de ELA. La evaluación neurológica de los animales así como la funcionalidad muscular y el control motor se realizaron semanalmente mediante pruebas estándar. Después de 90 días de tratamiento, se analizaron la corteza motora y la médula lumbar por microscopía electrónica, para comprobar la afectación de las motoneuronas. En paralelo, se analizó la presencia de agregados que contienen TDP-43 y ubiquitina, mediante doble inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-TDP-43 y anti-ubiquitina.

Los datos obtenidos a partir de imágenes de microscopía confocal demuestran que el tratamiento con L-BMAA da lugar a agregados patológicos de TDP-43 en el citosol de neuronas motoras de corteza cerebral y de médula lumbar que colocalizan con ubiquitina como ocurre en los enfermos de ELA.

Estos resultados por una parte avalan el modelo animal utilizado y, por otra, estarían de acuerdo con el papel que TDP-43 pueda tener como marcador de la enfermedad.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/etap

Effect of β -N-methylamino-L-alanine on oxidative stress of liver and kidney in rat

Estefanía de Munck^a, Emma Muñoz-Sáez^a, María Teresa Antonio^a, Javier Pineda^a, Amparo Herrera^a, Begoña G. Miguel^b, Rosa María Arahuetes^{a,*}

^a Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid 28040, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemical Sciences, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2012

Received in revised form

5 December 2012

Accepted 7 December 2012

Available online 20 December 2012

Keywords:

β -N-methylamino-L-alanine
(L-BMAA)

Oxidative stress

Liver

Kidney

ABSTRACT

β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid, found in the majority of cyanobacterial genera tested. Evidence for implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders, like amyotrophic lateral sclerosis (ALS), relies on bioaccumulation and biomagnification from symbiotic cyanobacteria. The involvement of L-BMAA in oxidative stress was demonstrated in several studies in the central nervous system. In the present study, we investigated the effect of L-BMAA on the oxidative stress responses of liver and kidney in rats treated by intraperitoneal administration with this amino acid. Oxidative stress was demonstrated by the quantification of lipid peroxidation, the measurement of both catalase and glutathione peroxidase activities, as well as the quantification of glutathione (GSH) levels and the total antioxidant capacity. It was observed that L-BMAA caused a significant increase in the degree of lipid peroxidation and catalase activity in both organs. A significant increase in glutathione peroxidase activity was obtained only in liver, whereas glutathione levels were also increased in both organs. The total antioxidant capacity decreased in liver and increased in kidney. These results suggest that the oxidative stress was higher in liver than in kidney, and might be crucial for L-BMAA toxicological action.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a highly neurotoxic non-protein and non-lipophilic amino acid, found in the majority of cyanobacterial genera tested (Cox et al., 2005). The association of neurodegenerative diseases (ALS, Parkinsonism dementia) with chronic exposition to amino acid L-BMAA has been suggested in the past (Papapetropoulos, 2007). Epidemiological studies linked traditional diet in the population of Guam islands with high incidence of neurological diseases, which were more than a hundred times more prevalent on Guam islands than any other parts of the world (Banack

et al., 2006; Borenstein et al., 2007). L-BMAA is produced by the cyanobacteria and its detection has been reported worldwide in a variety of aquatic and terrestrial environments, suggesting that it is ubiquitous (Cox et al., 2003, 2005).

Evidence for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders relies on its bioaccumulation and biomagnification through food chain (Murch et al., 2004). Uptake and accumulation of free L-BMAA by various non-symbiotic organisms, including aquatic macrophytes (Esterhuizen et al., 2011), has been documented but to date only a few ecotoxicological investigations have been published (Purdie et al., 2009; Lüring et al., 2011).

* Corresponding author. Tel.: +34 913944987; fax: +34 913944935.

E-mail address: rporterio@bio.ucm.es (R.M. Arahuetes).

1382-6689/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.12.004>

Since L-BMAA has been linked to neurodegenerative diseases, these results may have important relevance to human health. The discovery of regular biosynthesis of the neurotoxin L-BMAA in a large temperate aquatic ecosystem combined with its possible transfer and bioaccumulation within major food webs, some ending in human consumption, is alarming and requires attention (Brand et al., 2010; Jonasson et al., 2010). Mondo et al. (2012) suggest that consumption of shark fins may increase the risk for human exposure to the cyanobacterial neurotoxin L-BMAA, a neurotoxic amino acid which accumulates in biological tissues.

Limited information exists on the metabolism of L-BMAA other than oxidation by L-aminoacid oxidase (Hashmi and Anders, 1991) and that the α -N-acetyl derivative, conjecturally formed by N-acetylation by acetyl-CoA, is excreted by rats treated with L-BMAA (Reece and Nunn, 1989). L-BMAA is converted to methylamine in rat liver and kidney preparations (Nunn and Ponnusamy, 2009). The significance of this conversion being that chronic administration of methylamine to rats causes oxidative stress.

Given the evidence for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders, and its ability to generate oxidative stress, in this paper we investigated the effect of L-BMAA on the oxidative stress responses of liver and kidney responsible for its metabolism and excretion. Oxidative stress was measured by quantification of lipid peroxidation, as well as both catalase and glutathione peroxidase activities, GSH levels and total antioxidant capacity in both organs.

We have seen in laboratory rats treated with L-BMAA one month after birth, showed symptoms of neurological disorders six months later. For this reason we were interested to know more about the state of the animals, and so we set out to determine the degree of oxidative stress in liver and kidney.

2. Materials and methods

All experiments were performed in males and females Wistar rats, *Rattus norvegicus*, albinus variety, which were provided by Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain). The animals were maintained at a constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and in a reverse 12 h dark/light cycle (lights on at 20:00 h), with free access to food (commercial diet for rodents A04; Panlab, Barcelona, Spain) and water. The Animal Ethical Committee of University Complutense (Madrid, Spain) approved the experimental protocol. At their arrival, the rats were housed in standard laboratory cages, and acclimatized to the environmental conditions during two weeks. After this period, they were divided into two groups and maintained under the supervision of a licensed veterinarian in accordance with the principles set forth in the National Institute of Health guide for the care and use of laboratory animals.

2.1. Experimental groups

Group 1: Control animals, males and females.

Group 2: Experimental animals (males and females), one month old and weighing 50 g, are injected intraperitoneally with a daily L-BMAA (Sigma–Aldrich) dose of 250 mg/kg for consecutive 5 days.

This dosage was chosen following a review of the works of Polsky et al. (1972) and Seawright et al. (1990), in which, with a single high dose of L-BMAA (between 700 and 4000 mg/kg) were observed acute effects of toxin, while chronic 500 mg/kg per day dose over several days produced a cumulative effect leading to intoxication (Seawright et al., 1990).

The rats treated with L-BMAA under the above conditions, at the age of 7 months (6 months post-treatment) showed neurotoxic effects (motor and coordination impairment). To determine the affectation in L-BMAA treated animals, we have developed a neurological testing scale based on: animal ambulation, the tail suspension test and a strength test. The scale was evaluated from 0 to 10. The symptoms began in the first month after treatment with L-BMAA.

Control animals, which neurological evaluation was 0, showed these features: (1) they walked correctly stepping with all the foot sole, (2) referring to tail suspension test, control animals described a perfect “T” form with their forepaws respect to the principal body axis and (3) they responded with strength to a tail pull, without hindlimbsplay.

Animals treated with L-BMAA, which neurological evaluation was 7, showed these features: (1) they walked without stepping with all the foot sole, showing lateralization and bad body position, (2) they could not maintain the right “T” form in the tail suspension test, their hind limbs were relaxed and closer together and (3) they did not respond with strength to a tail pull, with hindlimbsplay.

Treated animals at 6 months post-treatment presented an assessment between 6 and 7. At this point, control and treated animals were sacrificed and liver and kidneys were rapidly removed and kept at -80°C until further analysis. Each group has at least 10 males and 10 females.

2.2. Lipid peroxidation assay

Lipid peroxides were estimated in kidney and liver samples by thiobarbituric acid (TBA) reaction with malondialdehyde (MDA), a product formed due to the peroxidation of membrane lipids, according to the method described by Ohkawa et al. (1979). Lipid peroxidation was expressed as nM of MDA formed/g of fresh tissue.

2.3. Enzyme assay

Catalase (CAT) activity was estimated in liver and kidneys by measuring the decrease in absorbance of oxygen peroxide at 240 nm, following the method described by Aebi (1984). Alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP) activity were assayed in the homogenates of liver and kidney following the p-nitrophenol method (Kufitinec and Miller, 1972), aspartate amino transferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) activities were assayed in liver samples spectrophotometrically (505 nm) according to the standard procedures using commercially available diagnostic kits (Sigma diagnostics). Glutathion peroxidase (GPx) activity was recorded (412 nm) using a diagnostic kit of Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, based on the reduction of GSH and H_2O_2 by this enzyme.

2.4. Biochemical analysis

All parameters were assayed in liver homogenates with the commercial kits SPINREACT (BIO ANALITICA S.L., MADRID): albumin by Bromocresol test; cholesterol and triglycerides by colorimetric–enzymatic tests based on Trinder's reaction (condensation of 4-amino-antipyrin with phenol in presence of H_2O_2 and peroxidase to yield a red chinonimine dye). Protein content was also determined in the homogenates (Lowry et al., 1951). Reduced glutathione (GSH) content in both liver and kidney was determined by the method of Ellman (Ellman, 1959), using 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) as reagent. Oxidized glutathione (GSSG) was measured using a Glutathione Assay Kit provided by MBL (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.). Finally, total anti oxidative capacity was estimated in liver and kidney samples by a kit provided by Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, based on the capacity of antioxidants of reducing Fe^{3+} to Fe^{2+} , which can be combined with phenantrene and produce a final compound measurable at 520 nm.

2.5. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (in tables) or mean \pm standard error of the mean (in figures). Analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether significant differences existed between control and treated groups. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether significant differences existed between groups according to sex and treatment. The differences between means were tested by Bonferroni's multiple range tests. A value of $p < 0.05$ was chosen as the minimal level of statistical significance.

3. Results

The study begins with an analysis of the liver profile of the rats treated, in order to know the effects induced by the xenobiotic agent in this organ. Table 1 shows that the hepatic protein content is increased in both males ($F = 7.95$, $p < 0.05$) and females ($F = 18.68$, $p < 0.01$), whereas albumin decreases significantly only in females ($F = 14.79$, $p < 0.01$). Cholesterol levels are increased only in females ($F = 5.57$, $p < 0.05$). Finally, we noted that in the liver enzymes evaluated, only the acid phosphatase (AcP) is significantly increased and in greater proportion in females ($F = 70.2$, $p < 0.01$) than in males ($F = 9.13$, $p < 0.05$). No changes were observed in transaminases activities.

There was no significant difference in total oxidative stress between the sexes either in liver or in kidney.

Our results show that L-BMAA causes in rat liver, both males and females, a significant increase in the degree of lipid peroxidation ($F = 12.76$, $p < 0.01$ and $F = 6.2$, $p < 0.05$ respectively) (Fig. 1), as well as in the activity of the enzymes catalase ($F = 21.02$, $p < 0.01$ and $F = 7.4$, $p < 0.05$) (Fig. 2) and glutathione peroxidase (only in males $F = 18.25$, $p < 0.01$) (Fig. 3). Glutathione levels were increased in both sexes, ($F = 44.8$, and $F = 15.4$, respectively; $p < 0.01$) (Fig. 4). Given the large increase in GSH levels in the liver, the values of GSSG have been

measured in this organ and, as could be expected since the GPx activity was increased in the treated animals, we found an increase of GSSG compared to the values measured in the control group (males: $F = 41.35$, $p < 0.001$; females: $F = 10.27$, $p < 0.001$) (Fig. 4). On the other hand, it is important to note the significant decrease suffered in the total hepatic antioxidant capacity in males ($F = 127.69$, $p < 0.01$), and females ($F = 72.18$, $p < 0.01$) (Fig. 5).

The results obtained in the kidneys of animals treated with L-BMAA (Figs. 1–5), show a significant increase in the level of lipid peroxidation (only in males: $F = 5.69$, $p < 0.05$), in catalase activity (males: $F = 37.54$, $p < 0.01$; females: $F = 6.75$, $p < 0.05$), and glutathione levels (only in males: $F = 10.42$, $p < 0.05$). But, unlike what happens in the liver, glutathione peroxidase activity declines significantly (males: $F = 10.1$, $p < 0.05$; females: $F = 6.66$, $p < 0.05$), while the total antioxidant capacity is increased (males: $F = 7.26$, $p < 0.05$; females: $F = 25.65$, $p < 0.01$) in the kidneys of both sexes L-BMAA treated rats.

4. Discussion

Cyanobacteria are ubiquitous and many of the species examined so far have been shown to produce the neurotoxic non-protein amino acid L-BMAA. Since human exposure to xenobiotic L-BMAA appears to be widespread, there is a potential to be a major environmental factor capable of causing ALS and other neurodegenerative diseases throughout the world (Bradley and Mash, 2009).

When the xenobiotic is subjected to the process of metabolism, this occurs through one or more enzymes of the antioxidant system. As it was mentioned above, L-BMAA is converted to methylamine in rat liver and kidney preparations (Nunn and Ponnusamy, 2009). The most important organ in this biotransformation is the liver, both in a qualitative and quantitative way, because it contains high levels of enzymes and other compounds that metabolize drugs, and because it quickly takes up xenobiotics from the blood (Guengerich, 1984). Moreover, kidney is mainly responsible of its excretion. Therefore, we investigated the effect of L-BMAA in these organs.

Several useful markers were chosen to assess liver damage (Table 1). The increase in the activity of alkaline and acid phosphatases as well as transaminases is within the widely understood parameters of liver adaptation to damaging factors (Satyalatha and Vardhani, 2005). In our study, a significant increase in hepatic protein content was detected, a fact probably related to the induction of detoxification enzymes (Valko et al., 2007). Moreover, the ACP activity also increased. ACP is used as an indicator of structural damage in the tissues caused by the increase in lysosomal activity resulting in cellular degeneration and necrosis (Teijón et al., 2006). In view of the results obtained, the administration of L-BMAA appears not to have harmful effects on liver function.

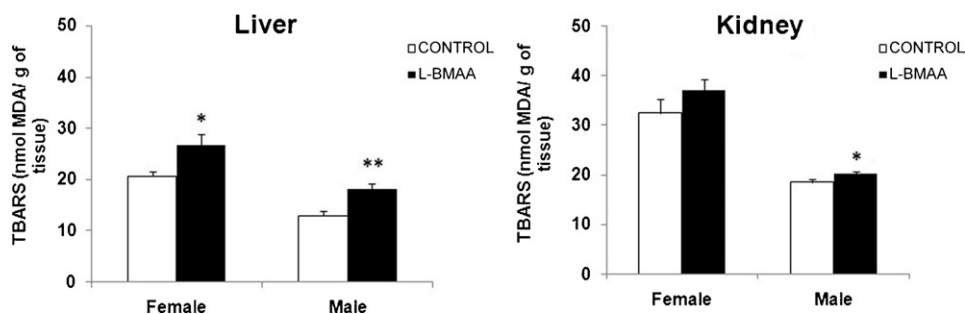
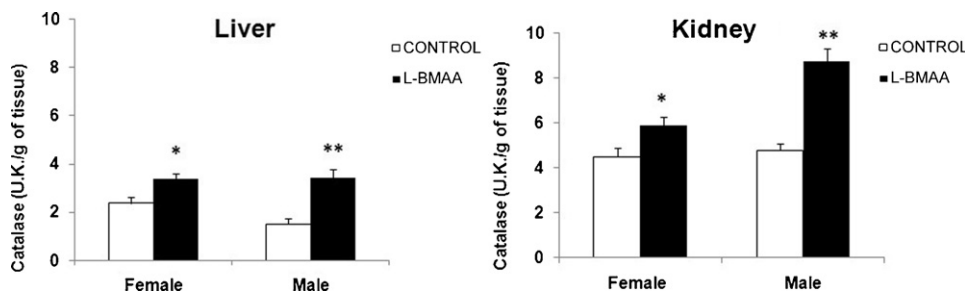
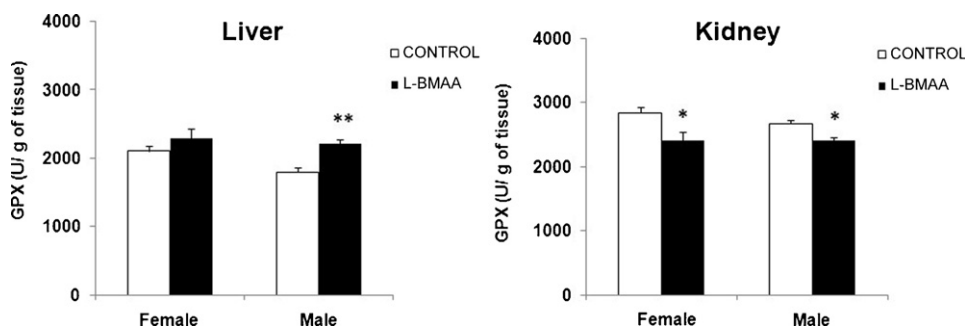
The involvement of L-BMAA in oxidative stress has been shown in several studies (Lobner et al., 2007; Liu et al., 2009), and this may be one mechanism by which it exerts its harmful effect. Oxidative stress is produced by disruption of the balance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems in the body. ROS such as hydrogen peroxide

Table 1 – Effect of L-BMAA administration on some biochemical hepatic parameters. All values are expressed in mean \pm SD (n = 7).

	Females		Males	
	Control	L-BMAA	Control	L-BMAA
Proteins (mg/g)	218 \pm 7	279 \pm 34**	198 \pm 14	222 \pm 14*
Albumin (mg/g)	132 \pm 19	94 \pm 16**	121 \pm 14	105 \pm 26
Cholesterol (mg/g)	1.88 \pm 0.27	2.51 \pm 0.65*	1.64 \pm 0.34	1.64 \pm 0.35
Triglycerids (mg/g)	9.13 \pm 3	12.57 \pm 2.62	11.55 \pm 2.62	14.24 \pm 2.05
AST (U/g)	1.41 \pm 0.11	1.47 \pm 0.19	1.31 \pm 0.08	1.29 \pm 0.1
ALT (U/g)	1.32 \pm 0.11	1.28 \pm 0.15	1.22 \pm 0.02	1.2 \pm 0.06
AcP (U/g)	1.58 \pm 0.17	2.43 \pm 0.21**	1.82 \pm 0.49	2.52 \pm 0.36*
ALP (U/g)	0.67 \pm 0.24	0.9 \pm 0.32	1.77 \pm 0.62	2.04 \pm 0.31

* Indicates difference at p-value <0.05 from control group.

** Indicates difference at p-value <0.01 from control group.

**Fig. 1 – Effect of L-BMAA administration on the TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) of hepatic and renal tissue. All values are expressed in mean \pm SEM (n = 7). *, ** indicates difference at p-value <0.05, <0.01, respectively from control group.****Fig. 2 – Effect of L-BMAA administration on the catalase activity of hepatic and renal tissue. All values are expressed in mean \pm SEM (n = 7). *, ** indicates difference at p-value <0.05, <0.01, respectively from control group.****Fig. 3 – Effect of L-BMAA administration on the GPx activity of hepatic and renal tissue. All values are expressed in mean \pm SEM (n = 7). *, ** indicates difference at p-value <0.05, <0.01, respectively from control group.**

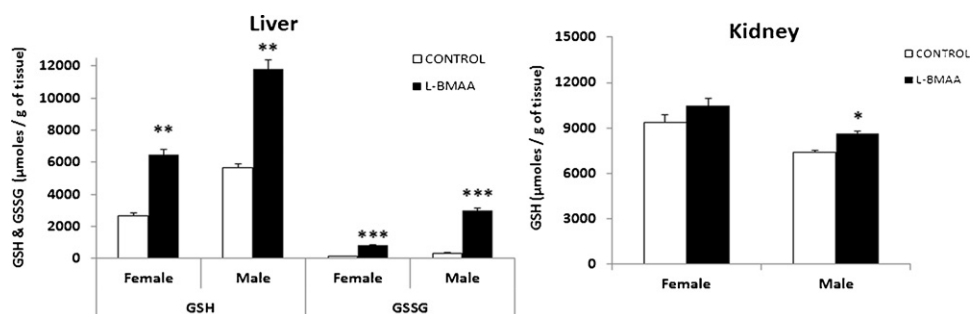


Fig. 4 – Effect of L-BMAA administration on the GSH and GSSG concentration of hepatic tissue and GSH concentration in renal tissue. All values are expressed in mean \pm SEM ($n = 7$). *, **, *** indicates difference at p -value < 0.05 , < 0.01 , < 0.001 , respectively from control group.

(H_2O_2), superoxide (O_2^-) and hydroxyl (OH^-) radicals are produced in cells as a result of metabolic processes (Vlahogianni et al., 2007). These ROS may induce cell damage by stimulation of lipid peroxidation (LPX) of cell membranes. Thus, cells require antioxidant systems such as glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), among others, to counteract the effects of ROS (Sinha et al., 2007). Therefore, a balance between pro-oxidant/antioxidant molecules and ROS scavenging is crucial to maintain cellular homeostasis.

To the best of our knowledge, this study is the first to examine the development of oxidative stress in the liver and kidney in rats, six months after treatment with L-BMAA. We have found high oxidative damage in liver and, to a lesser extent, in kidney.

In the present study, increased oxidative stress produced as a result of L-BMAA treatment is well marked by the enhanced TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) production in liver and kidney. Lipid damage was observed in rat liver in both females and males, with an increase in MDA levels of 31.7% and 39.8% respectively, compared with levels measured in control animals. Furthermore, we detected a trend toward increased levels of MDA in the kidneys of female rats, while this increase is significant only in male rats.

We found that oxidative lipid damage coincides with motor symptoms of the affected animal by treatment with L-BMAA. The data obtained about lipid peroxidation in the liver are in agreement with Miana-Mena et al. (2011), who also described oxidative lipid damage in the liver of the SODG93A mouse,

an animal model of ALS, which is already showing significant symptoms of motor system disorders.

Usually the harmful effects of oxidative stress are counteracted by natural defense mechanisms that involve enzymes like catalase and glutathione peroxidase. In our experiment, the activity of the catalase and glutathione peroxidase enzymes are significantly elevated in the liver of male rats treated (129.5% and 29.1%) and, to a lesser extent, in the liver of females (43.2% and 8.5%). It can be suggested that the enhancement of the antioxidant defense is a normal response to increase the detoxification process in these organs (Valko et al., 2007). This fact, together with the decrease in antioxidant total capacity in this organ and high lipid peroxidation, indicates that the liver suffers oxidative stress in response to the L-BMAA action.

On the other hand, the analysis conducted in the kidney demonstrated in both males and females that the activity of catalase, but not of glutathione peroxidase, is augmented. This fact, together with the increase in total antioxidants and less increase in the MDA amount in treated animals, could indicate that the kidney suffers a lower degree of oxidative stress than the liver. One possible explanation for this fact is, as happens with other xenobiotics (Henke, 2009), its metabolic intermediates may have a higher toxicity than the compound in its native form, and the liver being the only that is exposed to these transitional forms.

Glutathione plays a major role in maintaining intracellular redox state and acts as antioxidant by detoxifying a number of toxic metals, drugs and xenobiotics (Meister and Anderson,

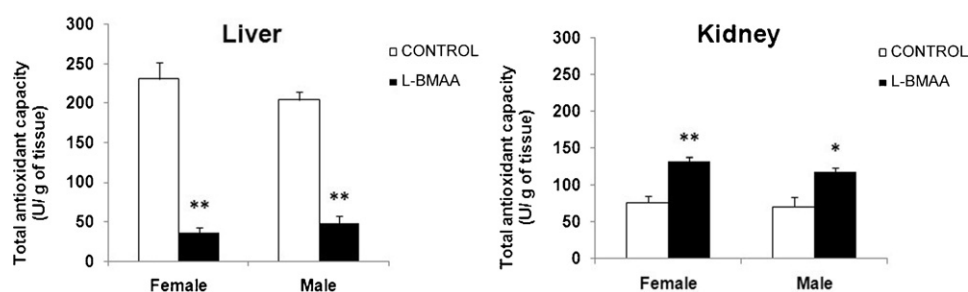


Fig. 5 – Effect of L-BMAA administration on the total antioxidant capacity of hepatic and renal tissue. All values are expressed in mean \pm SEM ($n = 7$). *, ** indicates difference at p -value < 0.05 , < 0.01 , respectively from control group.

1983). In the liver of male and female rats treated with the toxin, the GSH levels were more than the double than in control animals. In addition, the GSSG levels were also increased in treated animals.

When cells are exposed to increased levels of oxidative stress, GSSG will accumulate and the ratio of GSH to GSSG will decrease. Therefore, the determination of the GSH/GSSG ratio and the quantification of GSSG are useful indicators of oxidative stress in cells and tissues.

The most interesting part of these results founded in liver was that increased values of GSSG caused a considerable drop in the GSH/GSSG ratio. For females the ratio decreased by 60% compared to control animals and in the case of males the decrease was 76%. These results highlighted the marked oxidative stress that occurs in this organ by L-BMAA effects.

This last fact, together with the depletion of total antioxidants, enhanced lipid peroxidation and the increase of catalase and glutathione peroxidase enzymes activity could indicate the strong oxidative stress presented in this organ, which is, at least partially, offset by the protective effect of GSH.

In the kidney of these animals, there was an increase in GSH of only 14%. This low increase in glutathione could be offset by the high levels of total antioxidants (70%) and a minor lipid peroxidation.

It has been described in sub-acute xenobiotic administration, which produces oxidative stress (Maiti and Chatterjee, 2000), that the liver seems to be more protected than the kidneys by a rise in antioxidant compounds, such as glutathione. However, further studies are needed to confirm the possible protective effect of glutathione in the action of L-BMAA on the antioxidant defense system of the liver and the kidney.

5. Conclusions

Our results show that L-BMAA administration produces oxidative damage in liver and kidney, suggested by the significant increase of lipid peroxidation and high catalase activity. On the other hand, the liver seems to be more susceptible to the L-BMAA toxic action than the kidney, perhaps due to detoxification processes. Finally, given the evidences for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders, our study suggests that oxidative stress generated in the liver and kidney, although it is important, does not compromise the animal's life, which could promote its use in experimental animals in order to know more about the neurodegenerative diseases events.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the following grant: PPT-300000-2009-11 from the MEDINA Foundation.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Banack, S.A., Murch, S.J., Cox, P.A., 2006. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J. Ethnopharmacol.* 106, 97–104.
- Borenstein, A.R., Mortimer, J.A., Schofield, E., Wu, Y., Salmon, D.P., Gamst, A., Olichney, J., Thal, L.J., Silbert, L., Kaye, J., Craig, U.L., Schellenberg, G.D., Galasko, D.R., 2007. Cycad exposure and risk of dementia, MCI, and PDC in the Chamorro population of Guam. *Neurology* 68, 1764–1771.
- Bradley, W.G., Mash, D.C., 2009. Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph. Lateral. Scler.* 10, 7–20.
- Brand, L.E., Pablo, J., Compton, A., Hammerschlag, N., Mash, D.C., 2010. Cyanobacterial Blooms and the Occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs. *Harmful Algae* 1, 620–635.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13380–13383.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (14), 5074–5078.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Esterhuizen, M., Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2011. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 74–77.
- Guengerich, F.P., 1984. Effects of nutritive factors on metabolic processes involving bioactivation and detoxication of chemical. *Annu. Rev. Nutr.* 4, 207–231.
- Hashmi, M., Anders, M.W., 1991. Enzymatic reaction of beta-N-methylaminoalanine with L-amino acid oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1074, 36–39.
- Henke, K.R., 2009. *Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment*, 1st ed. John Wiley & Sons Ltd., United Kingdom.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spáčil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 18, 9252–9257.
- Kuftinec, M.M., Miller, S.A., 1972. Alkaline and acid phosphatase activities during growth of long bones and mandibles. *Calcified Tissue Res.* 9, 173–178.
- Liu, X., Rush, T., Zapata, J., Lobner, D., 2009. [beta]-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc-. *Exp. Neurol.* 217, 429–433.
- Lobner, D., Piana, P.M.T., Salous, A.K., Peoples, R.W., 2007. [beta]-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 25, 360–366.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lüring, M., Faassen, E.J., van Eenennaam, J.S., 2011. Effects of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the survival, mobility and reproduction of *Daphnia magna*. *J. Plankton Res.* 33, 333–342.
- Maiti, S., Chatterjee, A.K., 2000. Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic

- exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 8, 227–235.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Miana-Mena, F.J., González-Míngot, C., Larrodé, P., Muñoz, M.J., Oliván, S., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., Reiter, R.J., Osta, R., García, J.J., 2011. Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 258, 762–769.
- Mondo, K., Hammerschlag, N., Basile, M., Pablo, J., Banack, S.A., Mash, D.C., 2012. Cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Mar. Drugs* 10 (2), 509–520.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12228–12231.
- Nunn, P.B., Ponnusamy, M., 2009. β -N-methylaminoalanine (BMAA): metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat in vitro. *Toxicon* 54, 85–94.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yaqi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Papapetropoulos, S., 2007. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem. Int.* 50 (7–8), 998–1003.
- Polsky, F.I., Nunn, P.B., Bell, E.A., 1972. Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Fed. Proc.* 31 (5), 1473–1475.
- Purdie, E.L., Samsudin, S., Eddy, F.B., Codd, G.A., 2009. Effects of the cyanobacterial neurotoxin [beta]-N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 95, 279–284.
- Reece, D.M., Nunn, P.B., 1989. Synthesis of ^{14}C -labelled L-a-amino- β methylaminopropionic acid and its metabolism in the rat. *Biochem. Soc. Trans.* 17, 203–204.
- Satyalatha, B.D., Vardhani, V.V., 2005. Liver phosphatases in mice treated with lead during murine ancylostomiasis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 134–136.
- Seawright, A.A., Brown, A.W., Nolan, C.C., Cavanagh, J.B., 1990. Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, Lbeta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16 (2), 153–169.
- Sinha, S., Mallick, S., Misra, R.K., Singh, S., Basant, A., Gupta, A.K., 2007. Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 176–187.
- Teijón, C., Olmo, R., Blanco, D., Romero, A., Teijón, J.M., 2006. Low doses of lead: effects on reproduction and development in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 111, 151–165.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361–1371.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/etap

β -N-methylamino-L-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS

Estefanía de Munck^a, Emma Muñoz-Sáez^a, Begoña G. Miguel^b, M. Teresa Solas^c, Irene Ojeda^a, Ana Martínez^d, Carmen Gil^d, Rosa M^a Arahuetes^{a,*}

^a Departamento de Biología Animal II, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^c Departamento de Biología Celular, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^d Instituto de Química Médica – Centro Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2012

Received in revised form

3 April 2013

Accepted 10 April 2013

Available online 25 April 2013

Keywords:

β -N-methylamino-L-alanine

Lumbar spinal cord

Motor cortex

Rat sporadic Amyotrophic Lateral

Sclerosis model

ABSTRACT

β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid that has been related to various neurodegenerative diseases. The aim of this work was to analyze the biotoxicity produced by L-BMAA *in vivo* in rats, trying to elucidate its physiopathological mechanisms and to search for analogies between the found effects and pathologies like Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Our data demonstrated that the neurotoxic effects *in vivo* were dosage-dependent. For evaluating the state of the animals, a neurological evaluation scale was developed as well as a set of functional tests. Ultrastructural cell analysis of spinal motoneurons has revealed alterations both in endoplasmic reticulum and mitochondria. Since GSK3 β could play a role in some neuropathological processes, we analyzed the alterations occurring in GSK3 β levels in L-BMAA treated rats, we have observed an increase in the active form of GSK3 β levels in lumbar spinal cord and motor cerebral cortex. On the other hand, (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43) increased in L-BMAA treated animals. Our results indicated that N-acetylaspartate (NAA) declined in animals treated with L-BMAA, and the ratio of N-acetylaspartate/choline (NAA/Cho), N-acetylaspartate/creatine (NAA/Cr) and N-acetylaspartate/choline + creatine (NAA/Cho + Cr) tended to decrease in lumbar spinal cord and motor cortex. This project offers some encouraging results that could help establishing the progress in the development of an animal model of sporadic ALS and L-BMAA could be a useful tool for this purpose.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS-PDC, Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinson-Dementia complex; Cho, choline; Cr, creatine; ER, endoplasmic reticulum; GSK3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; NAA, N-acetylaspartate; L-BMAA, β -N-methylamino-L-alanine; TDP-43, (TAR)-DNA-binding protein 43.

* Corresponding author at: Departamento de Biología Animal II, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Nováis N° 2, 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 913944987; fax: +34 913944935.

E-mail address: rportero@bio.ucm.es (R.M. Arahuetes).

1382-6689/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.04.007>

1. Introduction

L-BMAA is a highly neurotoxic, non-protein and non-lipophilic amino acid, which is produced by most cyanobacteria (Cox et al., 2005; Banack et al., 2007). Cyanobacteria are widespread organisms that can exist either as free-living organisms or forming symbiotic associations in both aquatic and terrestrial environments (Esterhuizen and Downing, 2008; Metcalf et al., 2008). The presence of L-BMAA in mollusks and fish used for human consumption suggests that L-BMAA may bioaccumulate in aquatic food chains (Brand et al., 2010; Jonasson et al., 2010; Mondo et al., 2012). The detection of L-BMAA in seafood stresses the importance of evaluating the magnitude of human exposure to this neurotoxin.

During the last few years, L-BMAA has become relevant since it has been related with several neurodegenerative diseases. The first indication about this relation was shown by Spencer et al. (2010), who pointed to a relation between this amino acid and Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinson-Dementia Complex (ALS-PDC) in the Isle of Guam. Duncan et al. (1990) argued that massive amounts of flour would have to be consumed to generate a progressive neurological disease among the Chamorro people. Biomagnification (the increasing accumulation of bioactive, often deleterious molecules through successively higher trophic levels of a food chain) has been proposed by Cox and Sacks (2002) as a mechanism that could generate sufficiently high doses of cycad neurotoxins to produce neurological disease among the Chamorro people.

Other reports have found L-BMAA in brain tissue of patients with sporadic Alzheimer's disease in Canada (Murch et al., 2004). Furthermore, other subpopulations have been found to have a higher prevalence of ALS compared to normal population, namely: some groups of sportsmen, such as Italian football players (Chiò et al., 2005) and American football players (Abel, 2007); and Gulf War Veterans who stayed in Qatar desert (Cox et al., 2009). The common factor of all these events seems to be the exposure to environmental toxins present in football pitches and desert dust, where both cyanobacteria and L-BMAA have been found (Cox et al., 2005; Papapetropoulos, 2007; Bradley and Cox, 2009). Caller et al. (2012) reviewed the literature on important studies of spatial clustering of ALS and explore the hypothesized link between the neurotoxin L-BMAA and ALS. Goto et al. (2012) suggested that chronic exposure of small doses of L-BMAA by ingestion might represent at least one factor in the induction of neurodegenerative diseases such as ALS, Parkinson Disease or Alzheimer Disease.

In the presence of bicarbonate, L-BMAA generates a carbamylated adduct (Myers and Nelson, 1990) similar to glutamate, an excitatory amino acid involved in the pathogenesis of ALS. β -Carbamate form of L-BMAA increases intracellular calcium in a concentration-dependent way, which suggests that L-BMAA may play a role in excitotoxic neurodegeneration (Papapetropoulos, 2007).

Smith et al. (1992) reported that L-BMAA is likely transported by the neutral amino acid transporter of the adult blood brain barrier (BBB). L-BMAA is a mixed agonist for excitatory amino acid receptors. It has a low affinity for NMDA

receptors, which is only noticeable in the presence of bicarbonate, however it can activate metabotropic subtypes of receptors more powerfully (Brownson et al., 2002; Cucchiaroni et al., 2010).

Hence, three aspects of the mechanism by which L-BMAA exerts neurotoxicity are proposed: (1) direct activation of NMDA receptors, (2) activation of glutamate metabotropic receptors (mGluR5 and mGluR1) and (3) oxidative stress induction. L-BMAA inhibits cystine/glutamate exchange transporter (Xc-System), which mediates cystine absorption; as a consequence there is a loss of glutathione and oxidative stress increases. Moreover, this toxin appears to release glutamate via the Xc-System (Liu et al., 2009).

As described above, it has been hypothesized that L-BMAA can elicit ALS-PDC. Despite this fact, the hypothesis is still controversial, since intoxication assays with L-BMAA in animals have yielded uneven results (Karamyan and Speth, 2008). These results have been criticized because of the extraordinary variety they present about dose-effect correlation, difficult to extrapolate to the progression rate found in populations with neurodegenerative pathologies.

L-BMAA has been suggested to induce oxidative stress, to alter protein function through incorporation into proteins, and to induce neuronal degeneration via overactivation of glutamate receptors (Lobner et al., 2007; Murch et al., 2004). L-BMAA has also been reported to affect neurite outgrowth and neurofilament protein levels at low concentrations (Abdulla and Campbell, 1993).

There is evidence suggesting that mitochondria may be involved in cascades that take place in neurodegenerative diseases (Lezi and Swerdlow, 2012). In addition, recent data indicates that endoplasmic reticulum (ER) stress plays a central role in ALS pathogenesis (Walker and Atkin, 2011).

Recent findings have demonstrated that glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) can play an important role in several neurodegenerative disorders. Modulation of GSK3 β in brain areas devoted to cognitive function has become a major focus for treating neuropsychiatric and neurodegenerative diseases (Salcedo-Tello et al., 2011).

On the other hand, some degenerative diseases are likely associated with pathological aggregates of (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43). Under normal conditions, this protein is primarily located in the nucleus, whereas there are only small amounts in the cytosol (Winton et al., 2008; Brettschneider et al., 2012). It has been found that TDP-43 has a critical role in diverse neurodegenerative diseases, being a major component of Tau negative and ubiquitin-positive inclusions that characterize ALS (Lee et al., 2011).

Given this background, we did an exhaustive analysis on the dosage that should be administered in experimental animals and the subsequent effects, trying to search analogy between the effects found and pathologies like ALS. Currently, there is an animal model for familiar ALS (which represents only 5–10% of the cases of ALS), consisting of mutant mice for superoxide dismutase 1 (SOD1) (Gurney, 1994; Nagai et al., 2001). However, there is no model available for sporadic ALS research so that it would be interesting to establish it. Therefore with this paper we did the first step towards an experimental model for sporadic ALS and L-BMAA could be a valid tool for this purpose.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

The assays were accomplished using male rats, *Rattus norvegicus*, albinus variety, Wistar strain (Harlan Laboratories), which were kept in standard housing conditions (a regimen of 12 h light and 12 h darkness, with food and water *ad libitum*). The protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Complutense University of Madrid.

2.2. L-BMAA treatment

The way to administer L-BMAA was fixed to achieve a treatment to be the least aggressive for the animal and the easiest to reproduce. Therefore, intravenous and intraventricular injections were directly discarded, so we choose the intraperitoneal injection. Several data in the literature confirm neurological deficits in rats by intraperitoneal (Polsky et al., 1972; Seawright et al., 1990) L-BMAA administration.

In order to preserve the normal development of the nervous system, we do not begin treatment before weaning, postnatal

day 21 (weighting about 50 g). Doses administered to groups were from 100 to 350 mg/kg daily during 5 consecutive days. L-BMAA was dissolved in PBS (only vehicle in controls). The number of rats by group was never less than 10. In our study we used lower doses than authors mentioned above given that we hope to obtain chronic neurological damage.

After treatment, a set of functional and neurological evaluation tests were performed to check progression rate of treated individuals.

2.3. Weight progression control

To analyze the effect of L-BMAA on the normal development of these animals during and after treatment, we observed periodically the weight of the rats.

2.4. Neurological evaluation

The neurological evaluation has been established in a scale comprised between 0 and 10, where 0 is the evaluation given to animals which are not symptomatic, control animals, and 10 belongs to a state of total functional loss of the hindlimbs and postural control (Table 1). The evaluation is done by means of

Table 1 – Neurological evaluation scale.

	Ambulation	Tail lift test	Strength test
0	Animals lean the whole sole of their hindlimbs when walking at a normal speed	Hindlimbs positioned describing a T and/or coordinated kicking. Animals tend to climb to their tail pivoting laterally from the principal axis of the body	Hindlimbs keep under the body or very close to it. They respond to the pull stimulus in the opposite direction (resistance response) from the tail
1–2		Progressive loss of the T position	
3		Animals cannot describe a T with their hindlimbs. Uncoordinated kicking	
4	Animals do not lean the whole sole of their hindlimbs, they walk on tiptoe		
5		Animals stretch the hindlimbs backwards (caudal position)	When pulled from the tail, animals tend to split their hindlimbs away from the body and loose progressively their resistance response
6	When animals turn around, hindlimbs remain under the body (slower position correction)	Uncoordinated kicking	
7	Bad position, animals start to walk lateralwards	When hindlimbs are relaxed they remain very close together and prone to the anterior part of the body	Absence of resistance response (due to a lack of strength). Hindlimbs split away from the body
8	Hindlimbs do not respond correctly while walking (e.g. they slip)	Animals tend to grasp their hindlimbs together and try to climb to their tail pivoting frontally from the principal axis of the body	Hindlimbs markedly split away from the body
9	Loss of coordination when walking. Animals walk appreciably lateralwards		Abnormal back curvature during the test. Animals move laterally and have very few strength in their hindlimbs
10	Total loss of motor control of the hindlimbs Muscles spasm, whole body shakes		Total absence of hindlimbs strength

a blind study in which researchers do not know which animal is being observed. Animals injected with the vehicle showed no alteration in the neurological evaluation and, therefore, would be represented in the abscissa; for this reason this graphical representation has been omitted. The progression of both treated and control animals were observed weekly from the end of treatment until sacrifice.

The assessment of the neurological state is determined using three approaches implemented periodically: ambulation observation, the tail suspension test and the strength test. The three approaches of the assessment had not an equal contribution to the final neurological evaluation. Among the three parts of the neurological evaluation, the most important test was the tail suspension, which represents 70% of the total assessment, and the other two tests were used to fine-tune the details of the value with an importance of 15% each.

2.4.1. Ambulation

We observed both postural control and the way the hind limbs were leant during motion. This test was carried out introducing the rat inside a $20 \times 20 \times 100$ cm corridor.

2.4.2. Hind-foot reflex test

The rat was suspended by the tail 10 cm over the surface. We evaluated the ability to keep the hind limbs in the normal neutral position adopted by rodents in such situation, i.e. describing a “T”. The stiffness of the limbs and the inter-limb coordination during kicking were evaluated as well.

2.4.3. Strength test

The rats were set down on a flat surface, both forelegs and hindlimbs on it. Then, the tail was pulled softly to the opposite direction the animal moves. We observed the ability the rats had to drag and offer resistance, assessing their faculty to kept hindlimbs under the body without them spreading their legs away from it.

2.5. Functional assessments

In order to check if muscles were functional and how motor control evolves, a battery of tests was added as the different groups were treated with L-BMAA. Eventually, our aim was finding the most suitable tests to check the global condition of the animals. These trials let us analyze balance reflexes and motor coordination of the individuals, two different measurements were taken:

2.5.1. RotaRod

Two different RotaRod tests were implemented periodically one month after the treatment was finished.

1. The animal was placed on the RotaRod at a constant speed of 15 rpm for a maximum time of 10 min. The time the rats could stay on the axle was measured.
2. Maximum speed the animal could bear on the rod when this revs up from 4 to 40 rpm in 30 s.

2.5.2. Footprints

The hindlimbs were drenched with ink and the animal was hold by its back with both hands carefully, in such manner

that the body was parallel to the landing surface. Then, the animal was released from a height of 30 cm; afterwards, the distance between the footprints drawn on the surface when the rat falls was measured (Aoki et al., 2011).

The neurological evaluation and functional assessments was carried out to 10 animals for each treatment group. To verify the motor neurons state, tests described below were carried out with animals that had a neurological evaluation value not less than 7, which correspond to 80–100 days post-treatment animals with L-BMAA treatment of 300 mg/kg/day ($n=30$ treated animals). We sacrificed between 3 and 5 control animals and treated ones of this group for each analysis, so we made 3–5 replicates and 3 pseudo-replicates. Control and treated animals were sacrificed for each assay: electron microscopy (EM), immunohistochemistry, high resolution magic angle spinning (HR-MAS), GSK3 β , and TDP-43.

2.6. Electron microscopy

The most affected animals were sacrificed three months after treatment under general anaesthesia (ketamine/xylazine mixture; ketamine 100 mg/ml, xylazine 2%). Subsequently they underwent a perfusion with a fixative solution which contains paraformaldehyde 4% and glutaraldehyde 2.5% in a phosphate buffer 0.1 M and pH 7.3. Some fragments of the lumbar spinal cord were extracted and immediately submerged in the same fixative solution at 4 °C for 4 h. Then, the tissue was postfixed for 1 h in a 1:1 solution of osmium tetroxide 2% and aqueous potassium ferrocyanide 3%. The samples were next dehydrated in seriated solutions of acetone and eventually embedded in Spurr's resin. The ultrathin slices were stained with Reynold's lead citrate. The electron micrographs were obtained at 80 kV with an electron microscope JEOL 1010 equipped with a “Megaview” camera.

2.7. Immunohistochemistry

Ultrathin slices were fixed in 0.1% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at 4 °C. After washing in PBS, samples were dehydrated in successive ethanol solutions with progressive lowering of temperature to 30 °C and then embedded in Lowicryl K4M (PolyScience, Inc., Washington, USA) at 30 °C. The K4M resin was polymerized under UV light for 24 h at 30 °C and for 48 h at room temperature. Low-temperature dehydration, embedding, and polymerization were performed with an automatic freeze substitution system (Leica, Vienna, Austria). Ultrathin sections (70 nm) were obtained with an ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung, Vienna, Austria) and cocarrying ultrathin sections were sequentially floated in 0.1 M glycine in PBS and 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Grids were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-caspase 3 diluted 1:200 with PBS containing 1% BSA. After washing with PBS, the sections were incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody; goat anti-rabbit IgG (80 ng/ml) conjugated to 15-nm gold particles (British Biocell, Cardiff, UK) diluted 1:200 in PBS. After PBS and water washings, sections were stained with 2% uranyl acetate (20 min) and Reynold's lead citrate (3 min) and examined with a JEOL 1010 transmission electron

microscope. Controls were included by excluding the primary antibody.

2.8. Magnetic resonance spectroscopic experiments

Intact cerebral/spinal cord tissue was examined using high resolution magic angle spinning (HR-MAS) operating at 4 °C to minimize tissue degradation, ¹H NMR spectroscopy was performed at 500.13 MHz using a Bruker AMX500 spectrometer 11.7 T. These samples were placed within a 50 µl zirconium oxide rotor with cylindrical insert and spun at 4000 Hz spinning rate, to remove the effects of spinning side bands from the spectra acquired. Shimming and NMR preparation time was tried to keep to a minimum, but throughout this the NMR analysis was chilled to 4 °C to minimize metabolic changes. Under such conditions no noticeable degradation was observed during acquisition.

Standard solvent suppressed spectra were acquired into 16 k data points, averaged over 256 acquisitions, total acquisition 14 min using a sequence based on the first increment of the NOESY pulse sequence to effect suppression of the water resonance and limit the effect of B₀ and B₁ inhomogeneities in the spectra (relaxation delay–90°–t₁–90°–t_m–90°–acquire free induction decay (FID)) in which a secondary radio frequency irradiation field is applied at the water resonance frequency during the relaxation delay of 2 s and during the mixing period (t_m = 150 ms), with t₁ fixed at 3 µs. A spectral width of 8333.33 Hz was used. All spectra were processed using TOPSPIN software, version 1.3 (Bruker Rheinstetten, Germany). Prior to Fourier transformation, the FIDs were multiplied by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz. Spectra were phased, baseline-corrected and referenced to the sodium (3-trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate singlet at δ 0 ppm.

2.9. Analysis of GSK3β

Sections of frozen Lumbar spinal cords and motor cerebral cortex (150 mg) were homogenized in lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5), including EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) followed by centrifugation at 800 × g for 15 min. Protein concentrations of all samples were determined by Bradford assay (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis MO, USA). Protein (150 µg) from these supernatants were resolved by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore Corp.). Membranes were incubated with rabbit anti-GSK3β (Thermo Scientific) at 4 °C overnight or with rabbit anti P-(Ser9)-anti-GSK3β (Signalway Antibody). Following washing, blots were then incubated with HRP-conjugated secondary antibody and the proteins were detected by enhanced chemiluminescence.

2.10. Analysis of TDP-43

Frozen tissues from motor cortex of control and L-BMAA treated animals were used for the sequential extraction of proteins with buffers of increasing stringency, as described (Liu-Yesucevitz et al., 2010). Briefly, motor cortex was extracted at 5 ml/g (v/w) with low salt buffer (10 mmol/l

Table 2 – Metabolite percentage decrease respect to control animals, obtained by means of 1H-MRS in lumbar spinal and motor cortex. Data are presented as mean ± SD.

	Lumbar spinal cord	Motor cortex
NAA	13 ± 1.2%*	30 ± 2.9%**
NAA/Cr	17 ± 1.8%*	6 ± 2.0%
NAA/Cho	13 ± 1.0%*	30 ± 2.5%**
NAA/Cr + Cho	16 ± 1.3%*	15 ± 1.4%*
* p < 0.05.		
** p < 0.02.		

Tris, pH 7.5, 5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiothreitol, 10% sucrose, and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), high salt-Triton X-100 buffer (low salt buffer + 1% Triton X-100 + 0.5 mol/l NaCl), myelin flotation buffer (Triton X buffer containing 30% sucrose), and sarkosyl buffer (low salt buffer + 1% N-lauroyl-sarcosine + 0.5 mol/l NaCl). The detergent-insoluble materials were extracted in 0.25 ml/g of urea buffer (7 mol/l urea, 2 mol/l thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 30 mmol/l Tris, pH 8.5). Protein concentrations of all samples were determined by Bradford assay (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). For Western blot analysis, fractions (100 µg of proteins) were analyzed by using gradient PAGE on a 4–16% in a Tris-glycine gel and probed with anti-TDP43 (Protein Tech) and secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, Calbiochem). Digital images were acquired using a Fujifilm Intelligent Darkbox II (Fuji Systems USA, Stamford, CT).

2.11. Statistical analysis

The gathered results underwent a statistical analysis performed by GraphPad Prism 4. Data were adjusted to the most suitable regression model: weight by Boltzmann regression and both neurological evaluation and RotaRod by linear regression. The results yielded by footprint test were analyzed through a Friedman's test. Factors represented in Table 2 were analyzed using an F-test. p-Value was considered significant when p ≤ 0.05.

3. Results

3.1. L-BMAA treatment did not produce changes in the weight

The weight of the animals treated with L-BMAA did not vary significantly respect to controls in any case (Fig. 1).

3.2. L-BMAA treatment induced dosage-dependent neurological damage

Neurological damage of treated animals, with L-BMAA doses comprised between 100 mg/kg/day and 350 mg/kg/day, was shown in Fig. 2. The lower doses produced milder neurological damage that appeared later compared to other doses. Lineal regression analysis showed no differences between the treatments (200–350 mg/kg/day) and so we concluded that in this

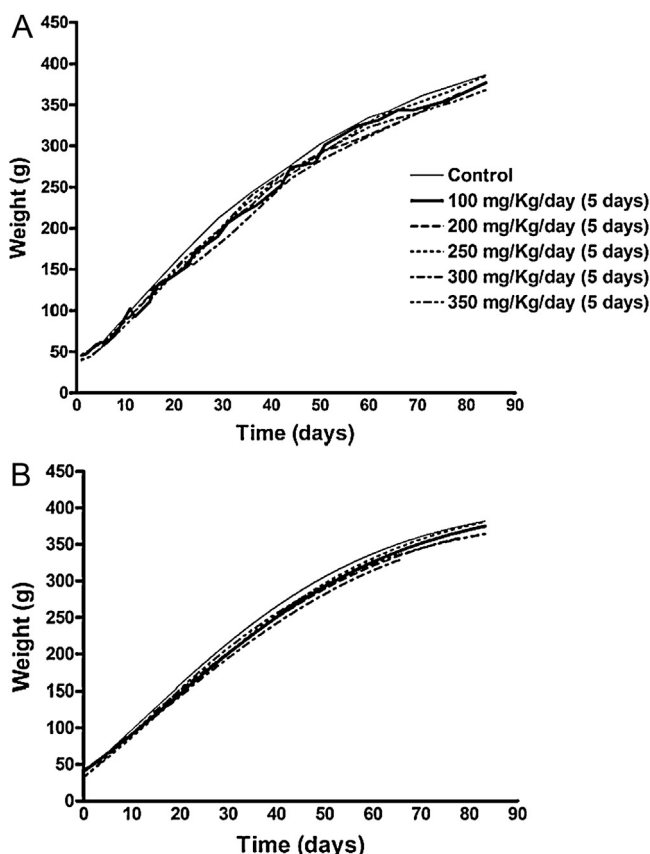


Fig. 1 – (A) Graphical representation of the weight evolution of control animals and L-BMAA treated animals from postnatal day 21. (B) Sigmoidal regression based on the Boltzmann equation showed that there are not significant differences between the curves. The number of animals per group is $n \geq 10$.

dosage interval a similar level of neurological damage was achieved.

The data corresponding to control animals did not shown in the graph (Fig. 2) because it overlaps with X-axis.

The results presented in this paper came from the group of animals treated with the dose of L-BMAA 300 mg/kg.

3.3. L-BMAA treatment caused neuromuscular alterations measured by means of functional assays as RotaRod test and footprint test

3.3.1. RotaRod

The results obtained with both RotaRod tests were:

1. Constant speed of 15 rpm: the time that both treated rats stay on the device compared to their respective controls was shorter ($p = 0.00043$) (Fig. 3A).
2. Acceleration mode: treated rats did not show significant differences with respect to controls (data not shown).

3.3.2. Footprints

Fig. 3B shows that treated animals did not spread their legs away from the body during landing as much as control

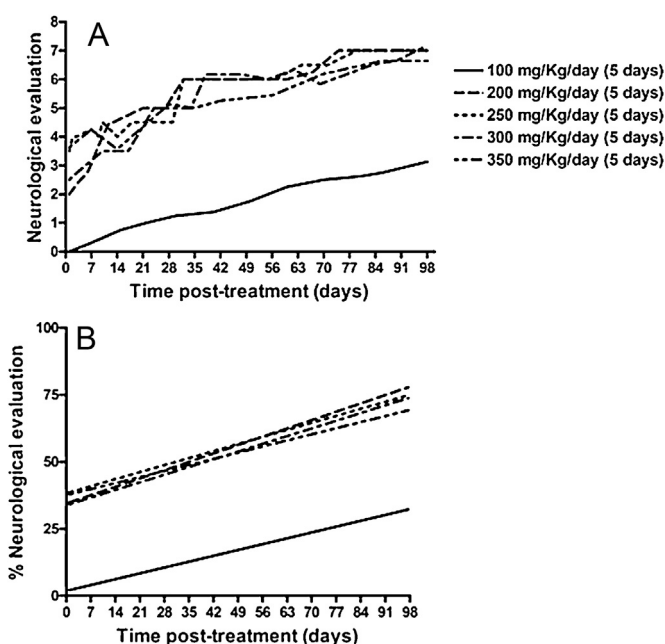


Fig. 2 – (A) Neurological evaluation carried out using the method described in Section 2.4. (B) Lineal regression showed no differences between the treatments (200–350 mg/kg/day). Comparing the 100 mg/kg/day with the rest of groups is highly significant in terms of elevation of the line: $F = 99.9155$, $p < 0.0001$. The data corresponding to control animals did not show in the graph because it overlaps with X-axis.

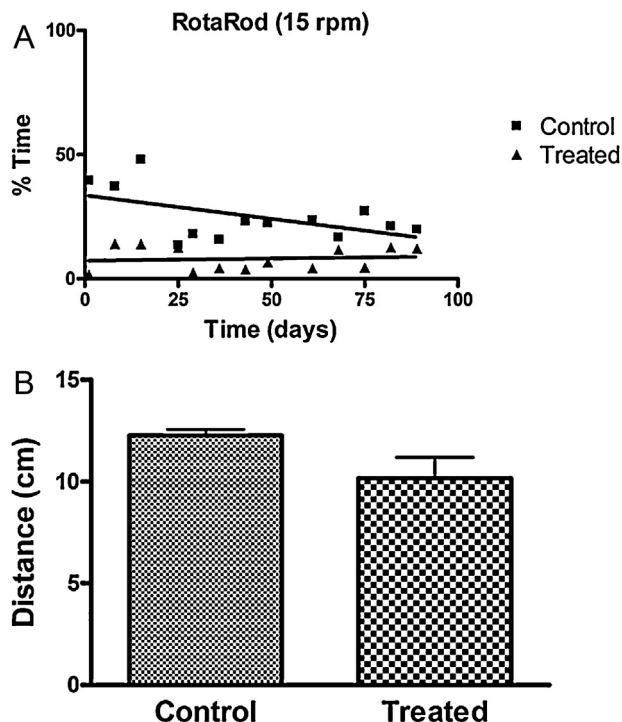


Fig. 3 – (A) RotaRod: constant speed of 15 rpm: linear regression showed that the time that treated rats stay on the device compared to their respective controls is shorter ($p = 0.00043$). (B) Test of footprints: represents the distance (cm) between the hindlings in the landing.

animals did. Although these differences were not significant, we observed that treated animals exhibit much more stiffness in their hindlimbs, which could affect the position while cushioning the fall (Fig. 3B).

3.4. Electron microscopy indicated mitochondrial alterations, endoplasmic reticulum disorganization and abundant presence of caspase-3 in motor neurons of the lumbar spinal cord from L-BMAA treated animals

We could observe some singular features in the spinal motor neurons in the pictures obtained from the lumbar spinal cord samples of treated animals: (1) The endoplasmic reticulum looked disassembled, had short and disorganized cisternae (Fig. 5), although some small areas remained organized. Besides, ribosomes were dissociated from ER in an abnormally

high proportion, thence giving the cytoplasm a dotted appearance. (2) Mitochondria showed initial stages of vacuolization, that is to say, their cristae were swollen, and moreover some of them were totally degenerated. (3) Immunohistochemical analysis indicated an abundant presence of caspase-3 in the perinuclear area of spinal motor neurons (Fig. 4). On the other hand, we had found some oligodendrocytes undergoing a cell death process, with typically apoptotic nuclei (Fig. 5).

3.5. Magnetic resonance spectroscopy experiments indicated that L-BMAA treated animals have alterations in NAA and in the ratios of NAA/Cr, NAA/Cho and NAA/Cr + Cho

Although more than 30 metabolites can be distinguished in healthy brains by 1H-MRS, N-acetylaspartate (NAA), total

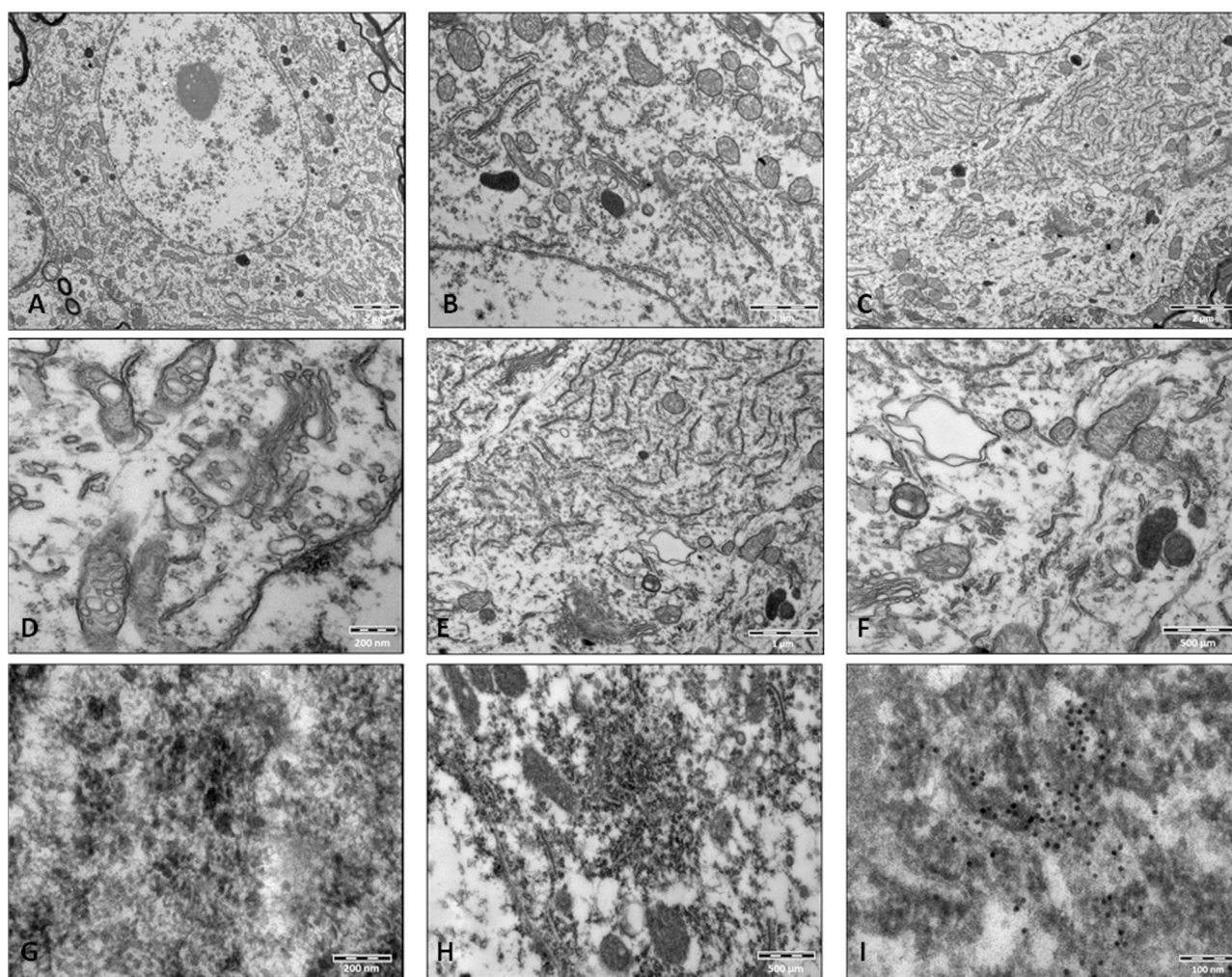


Fig. 4 – Lumbar spinal cord images of electron microscopy. A and B are images taken from control animals and the rest belong to rats with a neurological evaluation not less than 7. (A) (8 K, bar = 2 μ m) shows an overview of a motor neuron control. (B) (25 K, bar = 1 μ m) is a detail of A, showing the normal structure of the organelles (endoplasmic reticulum and mitochondria). (C) (12 K, bar = 2 μ m) is a panoramic view of a motor neuron belonging to a treated animal. (D) (25 K, bar = 200 nm), there are many mitochondria disorganized. (E) (25 K, bar = 1 μ m) there is fragmentation of the endoplasmic reticulum. (F) (50 K, bar = 500 μ m) image is a detail of degenerate mitochondria. (G)–(I) are images of immunohistochemistry, marking caspase-3. (G) (100 K, bar = 200 nm) correspond to motor neuron control. (H) (40 K, bar = 500 μ m) and (I) (200 K, bar = 100 nm) show caspase-3 in the perinuclear area of spinal motor neurons derived from animals treated with the amino acid.

creatine (Cr) and total choline (Cho) have been measured mostly due to their simple spectral patterns (singlet) and relatively high concentrations in the brain.

Both in spinal cord and cortex, NAA decreased $13 \pm 1.2\%$ y $30 \pm 2.9\%$, respectively. NAA/Cr ratio decreased significantly in the spinal cord ($17 \pm 1.8\%$) and scarcely in the cortex ($6 \pm 2.0\%$). NAA/Cho ratio decreased $13 \pm 1.0\%$ in the spinal cord and $30 \pm 2.5\%$ in the cortex. Finally, NAA/Cr + Cho ratio decreased in both tissues in a similar way $16 \pm 1.3\%$ y $15 \pm 1.4\%$.

3.6. GSK3 β increased in lumbar spinal cord and motor cortex in L-BMAA treated rats

Since GSK3 β could play a role in some neuropathological processes, we analyzed the alterations occurring in GSK3 β levels in L-BMAA treated rats. Our results indicated an increase in total GSK3 β levels in lumbar spinal cord and motor cerebral cortex. As shown in Fig. 6, the phosphorylated form of the enzyme also increased, but the difference between total GSK3 β and P-(Ser 9) GSK3 β was about 58% higher in the motor cortex of animals treated with L-BMAA (83331 Arb. Unit) than in the control animals (52757 Arb. Unit), indicating a net increase of GSK3 β activity.

3.7. High molecular forms of TDP-43 were accumulated in lumbar spinal cord of L-BMAA treated rats

We have investigated whether the treatment with L-BMAA evokes alterations in TDP-43, trying to find common factors between the action of the neurotoxic amino acid and the effects found in the ALS. Urea extracts demonstrated a marked increase in the amount of specific anti-TDP-43 high molecular weight bands in motor cerebral cortex of L-BMAA treated rats (Fig. 7).

4. Discussion

Given the interest evoked by the L-BMAA in recent years, our research has focused on the analysis of the toxicity of this amino acid to correlate its toxic effects with similar symptoms to sporadic ALS.

In vivo experiments have demonstrated that L-BMAA can cause a number of motor dysfunctions if ingested (Spencer et al., 1987a,b; Perry et al., 1989; Cruz-Aguado et al., 2006), injected intraperitoneally (Polsky et al., 1972; Seawright et al., 1990), injected intraventricular (Rakonczay et al., 1991; Matsuoka et al., 1993; Chang et al., 1993) or injected intraes-trial (Santiago et al., 2006; Buenz and Howe, 2007). *In vitro* experiments showed that this toxin binds to glutamate receptors with deleterious results (Weiss and Choi, 1988; Brownson et al., 2002; Liu et al., 2009; Chiu et al., 2012).

Goto et al. (2012), offers the first demonstration by intracellular recording of the effect of ingested L-BMAA on the postsynaptic response of an identified glutamatergic cell in a living, undissected organism (*Drosophila melanogaster*), and correlates these observations with the specific motor dysfunctions that result from ingestion. Their results suggest that L-BMAA acts as a glutamate agonist, causing NMDA receptor channels to remain open for prolonged periods of time,

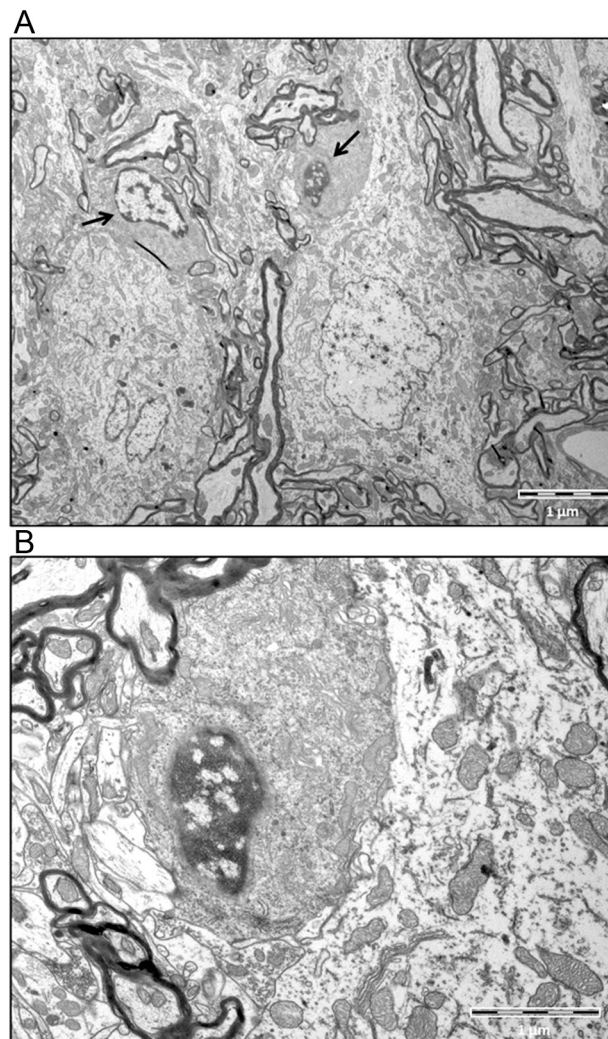


Fig. 5 – (A) (4K, bar = 1 μ m) is an overview of spinal cord showing two oligodendrocytes indicated by arrows. (B) (15 K, bar = 1 μ m) shows an expanded detail of an oligodendrocyte with a typically apoptotic nucleus.

thereby damaging the cell by excitotoxicity. The effect on the postsynaptic response became apparent days before the function of the postsynaptic cell (wing beat) became affected. Severely depolarized cells were able to fully recover with the removal of L-BMAA from the food source, suggesting that blocking L-BMAA binding in the brain might be a good treatment strategy.

First, we established the best age gap to start the treatment of the animals. An early treatment in newborn rats was discarded, because during the first 3 weeks after birth, rodents undergo the so called “brain growth spurt” (BGS), a stage characterized by rapid neurodevelopmental changes such as axonal and dendritic growth, establishment of neuronal connections, synaptogenesis and proliferation of glial cells followed by myelination (Davison and Dobbing, 1968). Karlsson et al. (2009a,b) have demonstrated that L-BMAA treatment of neonatal rats during the peak of BGS (PNDs 9–10) induced acute alterations such as impaired motor capacity and hyperactivity; this could be related with changes in the

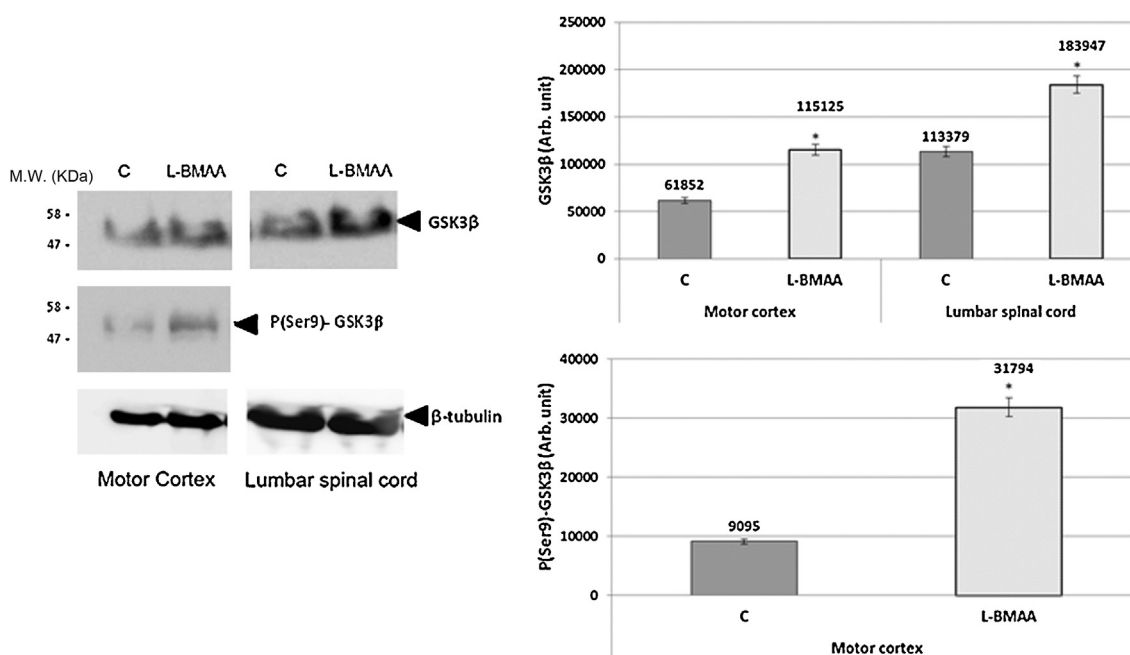


Fig. 6 – (A) Analysis of GSK3β and P(Ser 9)-GSK3β by Western Blot in motor cortex in animals control and treated with L-BMAA and analysis of GSK3β in spinal lumbar cord. (B) Protein bands were scanned and quantified using Multigauge Image software v3.0. The immunoblots were representative of one of three experiments with similar results. These results were quantified in arbitrary units and were represented in the attached graph as means ± S.E.M. (p*-value < 0.05).**

glutamatergic system. In fact, [Karlsson et al. \(2012\)](#) reported permanent effects of a low neonatal dose of L-BMAA in the adult hippocampus suggesting that L-BMAA could potentially disturb many processes during the development.

Thus, as described above, we decided carry out treatment outside the BGS stage, from day 21 post-natal, at weaning time.

Weight progression assessment of animals has shown that the treatment with L-BMAA at weaning time does not affect general development, which is in agreement with the results obtained by [Karlsson et al. \(2009a,b\)](#). These results allow us to discard the possibility that the treatment causes nutritional deficiency, since the weaning time is a key moment of the development and growth of animals.

In order to obtain a quick and chronic neurological impairment, our results show that the most effective dose is comprised between 200 and 350 mg/kg/day, injected daily for 5 consecutive days at weaning time, and we choose the 300 mg/kg dose of L-BMAA to carry out the study presented.

Glutamate receptors have distinct regional and temporal expression profiles, often with transient peak levels during the first neonatal weeks in rats. Most of the mRNA expression levels of NMDA receptor subunits are the highest during the same period ([Monyer et al., 1994](#)), suggesting that the high susceptibility towards L-BMAA during the neonatal period may be related to the peak expression of glutamate receptors. The neurological deficit observed in our animals, from day 1 post-treatment with L-BMAA, could be due to an initial activation of glutamate receptors leading to excitotoxicity.

The Rota-rod test at 15 rpm and the footprint test results suggested that there were certain difficulties in motor coordination of treated animals, leading us to further

investigation in order to check specifically if muscles were functional or not. These findings were in agreement with those obtained at the initial stages of the disease in the SOD1 transgenic murine model of familial ALS ([Naor et al., 2009](#)).

At the moment, SOD1 deficient murine model is the most accepted one to study ALS ([Gurney, 1994; Nagai et al., 2001](#)). However, in this model symptoms evolve very quickly from disease debut; so, an irreversible state is reached in a very short period of time. In our case, although the initial excitotoxicity is high, the neurological symptoms are appearing gradually and a worsening not becomes lethal, allowing us to study the evolution of the pathology.

The electron microscopy pictures confirm that motor neurons were affected at the lumbar spinal cord in treated animals. We observed abundant endoplasmic reticulum fragmentation and numerous free polyribosomes which are in agreement with the stress suffered by this organelle described in ALS due to the accumulation of misfolded proteins ([Urano et al., 2000; Murch et al., 2004; Igaz et al., 2011](#)). It has been reported that endoplasmic reticulum stress plays a central role in ALS pathogenesis. Moreover, endoplasmic reticulum stress also occurs in spinal cord tissue of sporadic ALS patients and, recently, it has been suggested that endoplasmic reticulum disassemblment could also occur in ALS cases associated with altered TDP-43 ([Walker and Atkin, 2011](#)). [Okle et al. \(2012\)](#) reported that SH-SY5Y cells treated with low L-BMAA concentrations showed a dysregulation of the cellular protein homeostasis with ensuing endoplasmic reticulum stress that is independent from high concentration effects such as excitotoxicity and oxidative stress.

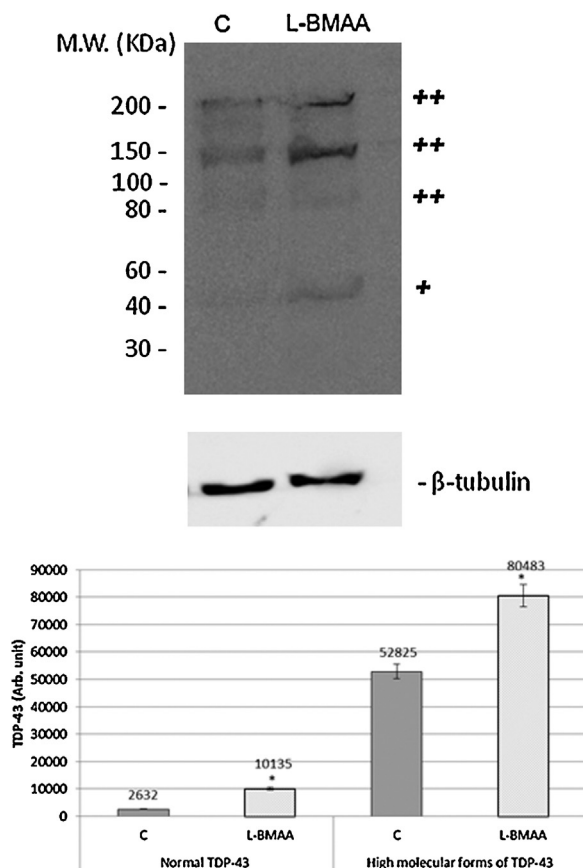


Fig. 7 – (A) Assay of TDP-43 by Western Blot in cerebral cortex of control and L-BMAA treated rats. Urea extracts were analyzed by immunoblotting with anti TDP-43 as indicated in 2.10. Several different species of TDP-43 could be observed, including bands corresponding to normal TDP-43 (+) and bands corresponding to high molecular forms of TDP-43 (++). **(B)** Protein bands were scanned and quantified using Multigauge Image software v3.0. The immunoblots were representative of one of three experiments with similar results. These results were quantified in arbitrary units and were represented in the attached graph as means \pm S.E.M. (* p -value < 0.05).

Mitochondria plays a complex role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases due to their involvement in a vast number of processes, including the regulation of excitotoxicity, the homeostasis of intracellular calcium, the production of reactive oxygen species and apoptotic processes (Lezi and Swerdlow, 2012). Our results showed swelling, vacuolization and disrupted mitochondria of spinal cord motor neurons of L-BMAA treated animals. These results were consistent with data found in studies related with ALS pathology (Costa et al., 2010). Mitochondrial dysfunction can trigger or propagate neurodegeneration and so it can be critically important for ALS development. Moreover, it is known that Ca^{2+} overload in neurons causes cell death. L-BMAA activation of glutamate receptors increases cytosolic Ca^{2+} concentration, therefore mitochondria greedily accumulate Ca^{2+} resulting in osmotic swelling and rupture of the outer mitochondrial membrane

(Chiu et al., 2011). In addition, it is a well-known fact that mitochondrial damage induces apoptosis and caspase-3 activation. Our results point those caspase-3 increases in the perinuclear area of spinal cord motor neurons induced by L-BMAA treatment.

Recent reports suggest that progressive motor neuron death in ALS may involve non-neuronal cells such as glial cells and skeletal muscle (Yoo and Ko, 2011). On the other hand, Sica et al. (2011) suggest that astrocytes may be the primary target hosting a still unknown external agent in ALS aetiology and pathogenesis. Apoptotic oligodendrocytes may reflect that glia is also affected, an issue which is also studied in other works that relate this dysfunction with neuronal alterations in neurodegenerative diseases (King et al., 2011). In addition, other authors have found morphological and biochemical myelin degeneration in lumbar and sacral sections of spinal cord of SOD1 rats (Niebroj-Dobosz et al., 2007). In our experiments we have seen oligodendrocytes with typical apoptotic nuclei in lumbar spinal cord from L-BMAA treated rats. However further study is required to deepen this point.

We have quantified NAA, Cr and Cho amounts. NAA is localized primarily in neurons and so its concentration in the brain is directly related to neuronal density, metabolism and functional status. Cr, which consists of creatine and phosphocreatine, indicates the status of cellular energy. Cho come from the brain cell membrane components glycerophosphocholine, phosphocholine and free choline, and provides information on membrane structural integrity, synthesis and degradation. Alterations in these metabolites have been used in the ALS diagnosis in humans (Rooney et al., 1998; Álvarez-Uría Tejero et al., 2011). This way, NAA decreases in L-BMAA treated rats. NAA/Cho, NAA/Cr and NAA/Cho + Cr ratios trend to decrease in lumbar spinal cord as well (Table 2). Our data are compatible with motor neuron diseases such as ALS.

On the other hand, it is known that neuronal damage appears together with an enhancement of glial activity, reflected by an increase in myoinositol (mIns) spectrum (Kalra and Arnold, 2006; Kalra et al., 2006). However, we have not found any variation in mIns spectrum yet, nor in lumbar spinal cord neither in motor cerebral cortex (data not show).

In the last few years, a big effort has been done to find biomarkers of neurodegenerative diseases. Therefore, we are interested in the measurement of GSK3 β and TDP-43.

GSK3 exists as two isoforms, GSK3 α and GSK3 β , which are inactivated by phosphorylation of Ser 21 (GSK3 α) and Ser 9 (GSK3 β) (Sutherland et al., 1993). The increase of GSK3 β is related to neurodegenerative diseases, especially to Alzheimer's disease. However, sometimes increased levels of GSK3 β have been found in ALS. An increased level of expression of GSK3 β has been described in frontal and temporal cortex of ALS patients with cognitive impairment (Yang et al., 2008). In this regard, our results evidence that through the mechanism of toxicity of L-BMAA, an increase in the synthesis of total GSK3 β can occur in both lumbar spinal cord and motor cortex. GSK3 β is active under normal resting conditions. However, L-BMAA treatment also increases the levels of the inactive form P-(Ser9)-GSK3 β . Since the difference between total GSK3 β and P-(Ser 9) GSK3 β is higher in the motor cortex of animals treated with L-BMAA than in the control animals, a net increase of GSK3 β activity is indicated.

Current ALS research has focused on the role of TDP-43 in neurodegeneration (Igaz et al., 2011). L-BMAA can bind to serine-tRNA and is incorporated into the polypeptide chain, the protein can no longer fold properly (Holtcamp, 2012). Clumps of misfolded proteins may form the aggregates that characterize neurodegenerative diseases. Our data suggest that L-BMAA increases high molecular forms of TDP-43, which could be produced by the addition of this amino acid to the TDP-43 protein. On the other hand, we have also observed basal levels of TDP-43 aggregates in control animals, which can be due to sample handling.

In view of the reported results, the major advantage of this possible sporadic ALS model is the slow progression of the disease. Thence the evolution of the animals can be observed more precisely. Furthermore, potential therapeutic drugs can be tested. It would be a relevant success if some of the ALS symptoms could revert.

5. Conclusions

We introduce a treatment based on the i.p. injection of the neurotoxic amino acid L-BMAA, using a dosage comprised between 200 and 350 mg/kg/day for 5 consecutive days at weaning time. Through this treatment, we obtained animals that display a neurological impairment compatible with sporadic ALS symptoms. These animals have ultrastructural alterations in both the ER and mitochondria, and present significant decreases in the NAA/Cho, NAA/Cr and NAA/Cho + Cr ratios. Everything points to an important neuronal damage in motor cortex and lumbar spinal cord. Moreover, the high molecular weight forms of TDP-43 remarkably increase, as a hallmark of ALS. Therefore this treatment could be the first step towards an experimental model for sporadic ALS.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We wish to express our gratefulness to NMR – ESR Center (UCM) and to Electron Microscopy Center (UCM) for their expert technical assistance. This work was supported by MINECO (PPT-300000-2009-11) and FUNDELA Foundation.

REFERENCES

- Abdulla, E.M., Campbell, I.C., 1993. L-BMAA and kainate-induced modulation of neurofilament concentrations as a measure of neurite outgrowth: implications for an in vitro test of neurotoxicity. *Toxicol. In Vitro* 7 (4), 341–344.
- Abel, E.L., 2007. Football increases the risk for Lou Gehrig's disease amyotrophic lateral sclerosis. *Percept. Mot. Skills* 104, 1251–1254.
- Álvarez-Uría Tejero, M.J., Sáiz Ayala, A., Fernández Rey, C., Santamarta Liébana, M.E., Costilla García, S., 2011. Diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica: avances en RM. *Radiología* 53, 146–155.
- Aoki, M., Warita, H., Mizuno, H., Suzuki, N., Yuki, S., Itoyama, Y., 2011. Feasibility study for functional test battery of SOD transgenic rat (H46R) and evaluation of edaravone a free radical scavenger. *Brain Res.* 1382, 321–325.
- Banack, S.A., Johnson, H.E., Cheng, R., Cox, P.A., 2007. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Mar. Drugs* 5 (4), 180–196.
- Bradley, W.G., Cox, P.A., 2009. Beyond Guam: cyanobacteria, BMAA and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10 (Suppl. 2), 5–6.
- Brand, L.E., Pablo, J., Compton, A., Hammerschlag, N., Mash, D.C., 2010. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs. *Harmful Algae* 1, 620–635.
- Brettschneider, J., Van Deerlin, V.M., Robinson, J.L., Kwong, L., Lee, E.B., Ali, Y.O., Safren, N., Monteiro, M.J., Toledo, J.B., Elman, L., McCluskey, L., Irwin, D.J., Grossman, M., Molina-Porcel, L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2012. Pattern of ubiquitin pathology in ALS and FTL indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol.* 123 (6), 825–839.
- Brownson, D.M., Mabry, T.J., Leslie, S.W., 2002. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J. Ethnopharmacol.* 82 (2–3), 159–167.
- Buenz, E.J., Howe, C.L., 2007. Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology* 28 (3), 702–704.
- Caller, T.A., Field, N.C., Chipman, J.W., Shi, X., Harris, B.T., Stommel, E.W., 2012. Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA. *Amyotroph. Lateral Scler.* 13 (1), 25–32.
- Chang, Y.C., Chiu, S.J., Kao, K.P., 1993. Beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decreases brain glutamate receptor number and induces behavioral changes in rats. *Chin. J. Physiol.* 36 (2), 79–84.
- Chiò, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R., Mora, G., 2005. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128 (Pt. 3), 472–476.
- Chiu, A.S., Gehring, M.M., Welch, J.H., Neilan, B.A., 2011. Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8 (9), 3728–3746.
- Chiu, A.S., Gehring, M.M., Braid, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H., Neilan, B.A., 2012. Excitotoxic potential of the cyanotoxin β -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicon* 60 (6), 1159–1165.
- Costa, J., Gomes, C., de Carvalho, M., 2010. Diagnosis, pathogenesis and therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 9 (6), 764–778.
- Cox, P.A., Sacks, O.W., 2002. Cycad neurotoxins: consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58 (6), 956–959, 26.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (14), 5074–5078.
- Cox, P.A., Richer, R., Metcalf, J.S., Banack, S.A., Codd, G.A., Bradley, W.G., 2009. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10 (Suppl. 2), 109–117.
- Cruz-Aguado, R., Winkler, D., Shaw, C.A., 2006. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2), 294–299.
- Cucchiaroni, M.L., Viscormi, M.T., Bernardi, G., Molinari, M., Guatteo, E., Mercuri, N.B., 2010. Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions

- of the cycad derivative beta-N-methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *J. Neurosci.* 30 (15), 5176–5188.
- Davison, A.N., Dobbing, J., 1968. The developing brain and vulnerable periods in developing brain. In: Davison, A.N., Dobbing, J. (Eds.), *Applied Neurochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 253–316.
- Duncan, M.W., Steele, J.C., Kopin, I.J., Markey, S.P., 1990. 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* 40 (5), 767–772.
- Esterhuizen, M., Downing, T.G., 2008. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71 (2), 309–313.
- Goto, J.J., Koenig, J.H., Ikeda, K., 2012. The physiological effect of ingested β -N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an in vivo preparation. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 156 (3–4), 171–177.
- Gurney, M.E., 1994. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 331 (25), 1721–1722.
- Holtkamp, W., 2012. The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease? *Environ. Health Perspect.* 120, 110–116.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Lee, E.B., Chen-Plotkin, A., Swanson, E., Unger, T., Malunda, J., Xu, Y., Winton, M.J., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2011. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J. Clin. Invest.* 121 (2), 726–738.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spáčil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9252–9257.
- Kalra, S., Arnold, D.L., 2006. Magnetic resonance spectroscopy for monitoring neuronal integrity in amyotrophic lateral sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 576, 275–282.
- Kalra, S., Hanstock, C.C., Martin, W.R., Allen, P.S., Johnston, W.S., 2006. Detection of cerebral degeneration in amyotrophic lateral sclerosis using high-field magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Neurol.* 63, 1144–1148.
- Karamyan, V.T., Speth, R.C., 2008. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.* 82 (5–6), 233–246.
- Karlsson, O., Lindquist, N.G., Brittebo, E.B., Roman, E., 2009a. Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol. Sci.* 109 (2), 286–295.
- Karlsson, O., Roman, E., Brittebo, E.B., 2009b. Long-term cognitive impairments in adult rats treated neonatally with beta-N-methylamino-L-alanine. *Toxicol. Sci.* 112 (1), 185–195.
- Karlsson, O., Berg, A.L., Lindström, A.K., Arnerup, G., Roman, E., Bergquist, J., Hanrieder, J., Lindquist, N.G., Brittebo, E., Andersson, M., 2012. Neonatal exposure to the cyanobacterial toxin BMAA induces changes in protein expression, and neurodegeneration in adult hippocampus. *Toxicol. Sci.* 130 (2), 391–404.
- King, A.E., Dickson, T.C., Blizzard, C.A., Woodhouse, A., Foster, S.S., Chung, R.S., Vickers, J.C., 2011. Neuron-glia interactions underlie ALS-like axonal cytoskeletal pathology. *Neurobiol. Aging* 32 (3), 459–469.
- Lee, V.M., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2011. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP 43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 38–50.
- Lezi, E., Swerdlow, R.H., 2012. Mitochondria in neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 269–286.
- Liu, X., Rush, T., Zapata, J., Lobner, D., 2009. beta-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(–). *Exp. Neurol.* 217 (2), 429–433.
- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y.J., Vanderwyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L., Wolozin, B., 2010. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS ONE* 5, e13250.
- Lobner, D., Piana, P.M.T., Salous, A.K., Peoples, R.W., 2007. [beta]-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 25, 360–366.
- Matsuoka, Y., Rakonczay, Z., Giacobini, E., Naritoku, D., 1993. L-Beta-methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44 (3), 727–734.
- Metcalfe, J.S., Banack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A., Codd, G.A., 2008. Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environ. Microbiol.* 10 (3), 702–708.
- Mondo, K., Hammerschlag, N., Basile, M., Pablo, J., Banack, S.A., Mash, D.C., 2012. Cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Mar. Drugs* 10 (2), 509–520.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W., 2004. Occurrence of beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* 110 (4), 267–269.
- Myers, T.G., Nelson, S.D., 1990. Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by ^{13}C NMR. *J. Biol. Chem.* 265 (18), 10193–10195.
- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown Jr., R.H., Itoyama, Y., 2001. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21 (23), 9246–9254.
- Naor, S., Keren, Z., Bronshtein, T., Goren, E., Machluf, M., Melamed, D., 2009. Development of ALS-like disease in SOD-1 mice deficient of B lymphocytes. *J. Neurol.* 256 (8), 1228–1235.
- Niebroj-Dobosz, I., Rafałowska, J., Fidziańska, A., Gadamski, R., Grieb, P., 2007. Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. *Folia Neuropathol.* 45 (4), 236–241.
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., Dietrich, D.R., 2012. L-BMAA induced ER-stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low non-excitotoxic concentrations. *Toxicol. Sci.* 130 (2), 391–404.
- Papapetropoulos, S., 2007. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem. Int.* 50 (7–8), 998–1003.
- Perry, T.L., Bergeron, C., Biro, A.J., Hansen, S., 1989. Beta-N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J. Neurol. Sci.* 94 (1–3), 173–180.
- Polsky, F.I., Nunn, P.B., Bell, E.A., 1972. Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Fed. Proc.* 31 (5), 1473–1475.
- Rakonczay, Z., Matsuoka, Y., Giacobini, E., 1991. Effects of L-beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat. *J. Neurosci. Res.* 29 (1), 121–126.
- Rooney, W.D., Miller, R.G., Gelin, D., Schuff, N., Maudsley, A.A., Weiner, M.W., 1998. Decreased N-acetylaspartate in motor cortex and corticospinal tract in ALS. *Neurology* 50 (6), 1800–1805.

- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., Arias, C., 2011. [GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *Int. J. Alzheimer Dis.* 2011, 189728.](#)
- Santiago, M., Matarredona, E.R., Machado, A., Cano, J., 2006. [Acute perfusion of BMAA in the rat's striatum by in vivo microdialysis. *Toxicol. Lett.* 167 \(1\), 34–39.](#)
- Seawright, A.A., Brown, A.W., Nolan, C.C., Cavanagh, J.B., 1990. [Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-beta-methylaminoalanine \(L-BMAA\), in rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16 \(2\), 153–169.](#)
- Sica, R.E., Incola, A.F., Deniselle, M.C., Rodriguez, G., Monachelli, G.M., Peralta, L.M., Bettini, M., 2011. [Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: new hypothesis regarding its etiology and pathogenesis suggests that astrocytes might be the primary target hosting a still unknown external agent. *Arq. Neuropsiquiatr.* 69 \(4\), 699–706.](#)
- Smith, Q.R., Nagura, H., Takada, Y., Duncan, M.W., 1992. [Facilitated transport of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine, across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 58, 1330–1337.](#)
- Spencer, P.S., Hugon, J., Ludolph, A., Nunn, P.B., Ross, S.M., Roy, D.N., Schaumburg, H.H., 1987a. [Discovery and partial characterization of primate motor-system toxins. *Ciba Found. Symp.* 126, 221–238.](#)
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C., 1987b. [Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237 \(4814\), 517–522.](#)
- Spencer, P.S., Lasarev, M.R., Palmer, V.S., Kisby, G.E., 2010. [Neurotoxic cycad components and Western Pacific ALS/PDC. *Ann. Neurol.* 68 \(6\), 975–976.](#)
- Sutherland, C., Leighton, I.A., Cohen, P., 1993. [Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signaling. *Biochem. J.* 296, 15–19.](#)
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. [Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.](#)
- Walker, A.K., Atkin, J.D., 2011. [Stress signaling from the endoplasmic reticulum: a central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *IUBMB Life* 63 \(9\), 754–763.](#)
- Weiss, J.H., Choi, D.W., 1988. [Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science* 241, 973–975.](#)
- Winton, M.J., Igaz, L.M., Wong, M.M., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2008. [Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA binding protein \(TDP-43\) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J. Biol. Chem.* 283, 13302–13309.](#)
- Yang, W., Leystra-Lantz, C., Strong, M.J., 2008. [Upregulation of GSK3 \$\beta\$ expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment \(ALSci\). *Brain Res.* 1196, 131–139.](#)
- Yoo, Y.E., Ko, C.P., 2011. [Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 231 \(1\), 147–159.](#)

Letter

β -N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma

Emma Muñoz-Saez¹, Estefanía de Munck², Rosa M. Arahuetes², M. Teresa Solas³,
Ana M. Martínez¹ and Begoña G. Miguel¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Departamento de Biología Animal II, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

³Departamento de Biología Celular, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

(Received January 3, 2013; Accepted March 11, 2013)

ABSTRACT — β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid produced by most cyanobacteria, which are extensively distributed in different environments all over the world. L-BMAA has been linked to a variety of neurodegenerative diseases. This work aims to analyze the toxicological action of L-BMAA related to alterations observed in different neurodegenerative illness as Alzheimer disease and amyotrophic lateral sclerosis. Our results demonstrate that neuroblastoma cells treated with L-BMAA show an increase in glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and induce accumulation of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) truncated forms (C-terminal fragments), phosphorylated and high molecular weight forms of TDP-43, that appears frequently in some neurodegenerative diseases.

Key words: β -N-methylamino-L-alanine, Glycogen synthase kinase-3, TAR DNA-binding protein

INTRODUCTION

β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is routinely described in the literature as a neurotoxin, which is produced by most cyanobacteria (Lee and McGeer, 2012). In the last few years L-BMAA has become relevant, because it has been related to several neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS-PDC), Alzheimer disease (AD) and ALS (Holtcamp, 2012). Recent findings have demonstrated that glycogen synthase kinase-3 (GSK3) can play an important role in several disorders, AD in particular (Salcedo-Tello *et al.*, 2011). GSK3 exists as two isoforms, GSK3 α and GSK3 β , which are inactivated by phosphorylation of Ser 21 (GSK3 α) and Ser 9 (GSK3 β). This phosphorylation causes its inactivation and is the primary mechanism responsible for growth factor inhibition of this kinase (Sutherland *et al.*, 1993). Another important hallmark of neurodegenerative diseases is the formation of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) pathological aggregates. Under normal conditions, TDP-43 is predominantly located in the nucleus, but in pathological conditions is translocated to the cytosol and form aggregates (Brettschneider *et al.*, 2012). It has been found that this protein is the major component of tau negative and ubiquitin-positive inclusions that characterize some neurodegenerative diseases (Lee *et al.*, 2011). Taking into account the role of GSK3 β and TDP-43 as possible neurodegenerative disease hallmarks, the goal of this work is to know whether L-BMAA causes alterations in GSK3 β and TDP-43 in neuroblastoma cells, in conditions under which L-BMAA produces neuronal death.

MATERIALS AND METHODS

L-BMAA treatment and cell viability assay

SH-SY5Y human neuroblastoma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin and 1% glutamine in a humidified incubator in 95% air-5% CO₂ at 37°C. L-BMAA (Sigma-Aldrich) was dissolved in 10 mM sodium bicarbonate. L-BMAA is added when cells reach 80% of confluence. Cellular viability was determined by MTT assay previously described (Alley *et al.*, 1988).

Subcellular fractionation, protein isolation and immunoblots

The human cell lines chosen for this study were SH-

Correspondence: Begoña G. Miguel (E-mail: begonnagomezmguel@gmail.com)

SY5Y cells. This cell line has been widely used as model of neurons, since these cells possess many biochemical and functional properties of neurons (Xie *et al.*, 2010). Cells treated with L-BMAA were resuspended in a ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl), with protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Lysated cells are considered as total extract. Nuclear and cytosolic fractions were obtained as described previously (Calcerrada *et al.*, 2002). Protein fraction (50 µg) was analyzed by SDS-PAGE on a 10% Tris-glycine gel. To examine the effect of L-BMAA on TDP-43, urea extraction was performed as previously described (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010). Urea-fraction (100 µg of protein) was analyzed by using gradient PAGE on a 4-16% in a Tris-glycine gel.

To immunodetection analysis, gel electrophoresis were transferred to nitrocellulose, and probed with rabbit polyclonal primary antibodies: anti-GSK3 α/β , anti-*p*-GSK3 β (Ser9), anti-ubiquitin and anti- α -tubulin (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-TDP-43 and anti-*p*S409/410 (ProteinTech Group, Chicago, IL, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody was purchased from ProteinTech Group. Digital images were acquired using a Fujifilm Intelligent Darkbox II (Fuji Systems USA, Stamford, CT, USA).

Statistical analysis

Results are presented as means \pm S.D. in this article. The data from each biochemical experiment were analyzed separately and treated by ANOVA. Experiments were repeated three times with triplicate samples for each experiment. Student's *t*-test was also used to compare the samples. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

To examine the action of L-BMAA on cell viability, SH-SY5Y cultures were treated with different amino acid concentrations for different times. Our results indicated that L-BMAA decreases cellular viability in a dose-response manner, being the maximal effect about a 32% (Fig. 1). Cell death was L-BMAA concentration dependent, increased with exposure time, resulting after 48 hr greater than 24 hr (Fig. 1).

Taking into account the important role of GSK3 β in the neurodegenerative processes (Salcedo-Tello *et al.*, 2011), we analyzed the levels and the subcellular distribution of this enzyme after 10 mM L-BMAA treatment. Results showed an increase in GSK3 β levels concomitant with a *p*-GSK3 β (Ser9) decrease in cellular total extracts after L-BMAA treatment, this fact would indicate that an enzyme activation takes place. When the nuclear fraction was analyzed, an increase in GSK3 β was observed, with-

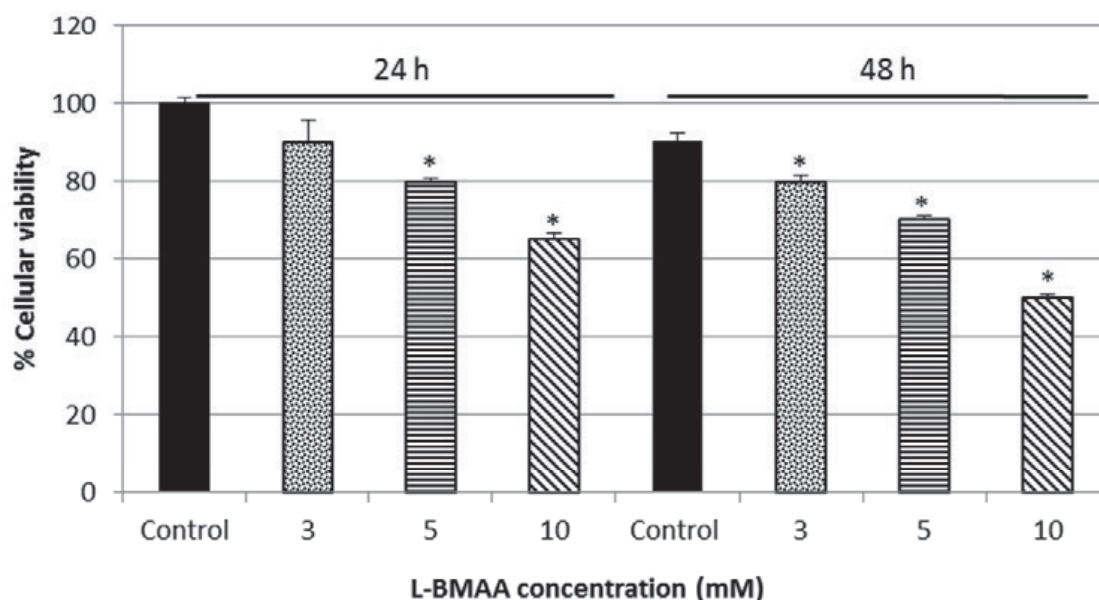


Fig. 1. Effect of L-BMAA on SH-SY5Y neuroblastoma cell viability. Experiments are mean \pm S.D.* Statistically significant difference from the corresponding control value ($p \leq 0.05$).

Action of L-BMAA on GSK3 and TDP-43 in neuroblastoma

out any change in the cytosol (Fig. 2). In the same figure, it can be appreciated that an increase in nuclear GSK3 α occurs. Although in recent years GSK3 β has been the main isoform related with neurodegeneration, GSK3 α has also been described to play a possible role in the pathological process such as ALS and AD (Chung *et al.*, 2008; Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2011).

In order to determine whether L-BMAA treatment may result in altered forms of TDP-43, appearing frequently in neurodegenerative diseases forming pathological aggregates, high molecular weight, phosphorylated and truncated forms were analyzed. Our data indicated that the addition of L-BMAA caused an increase in insoluble TDP-43 and pS(409/410)TDP-43, together with the appearance of high molecular weight TDP-43 forms and insoluble 25 kD and 35 kD low molecular weight fragments of this

protein (Figs. 3A and 3C). Furthermore, the results also indicated that the addition of L-BMAA caused a high degree of protein ubiquitination (Fig. 3B). It is noteworthy that the presence of ubiquitinated inclusions has been reported as a hallmark of most adult onset neuropathological disorders (Yamamoto and Simonsen, 2011).

DISCUSSION

Since the discovery of amino acid L-BMAA as neurotoxin, a great deal has been learned about its mechanism of action. The main mechanism of neurotoxicity of L-BMAA has been reported to be a receptor agonist of glutamate (Ross *et al.*, 1987; Chiu *et al.*, 2012). However, exactly how it causes neuronal death is not well understood. The finding that L-BMAA directly induces neu-

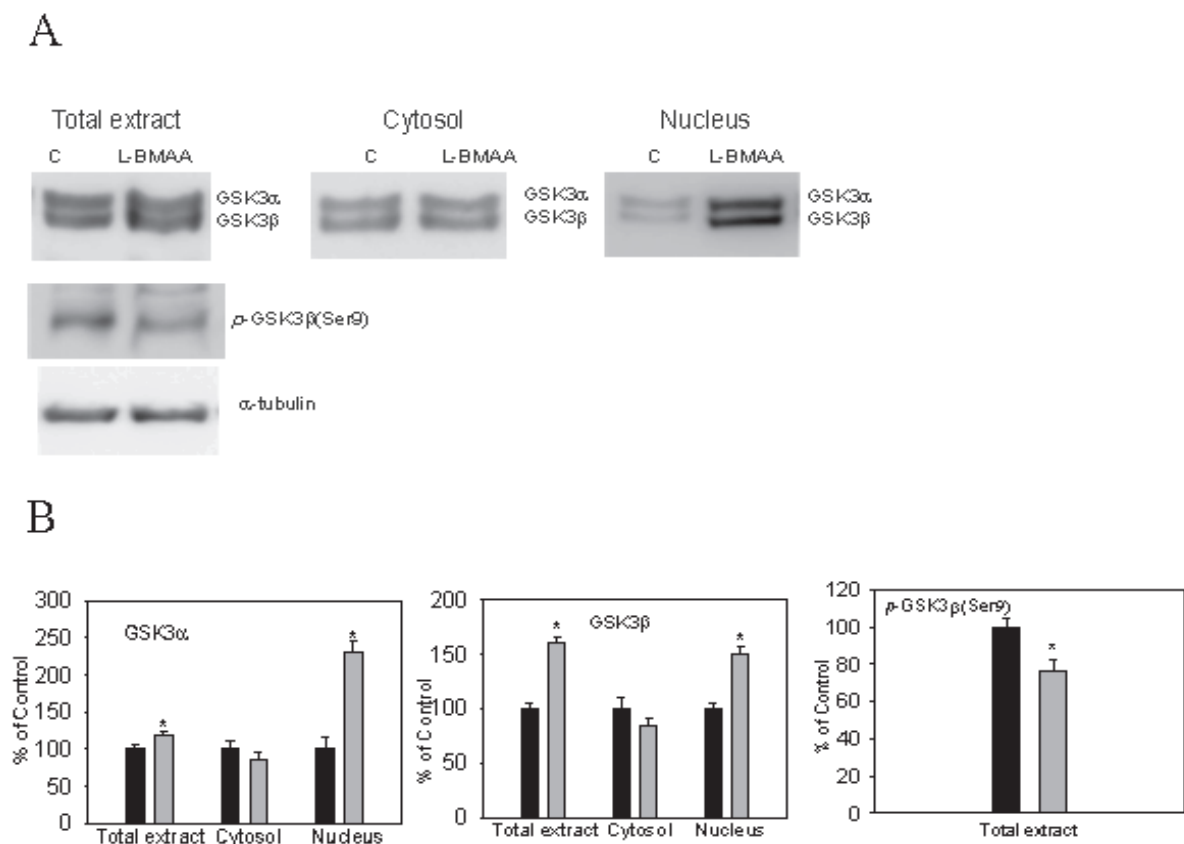


Fig. 2. Effect of L-BMAA on GSK3 α/β in SH-SY5Y neuroblastoma cells. A) Western blot of GSK3 α/β and p-GSK3 β (Ser9) in total extract in untreated (C) and treated with 10 mM L-BMAA for 24 hr. Western blots of GSK3 α/β in cytosol and nucleus fractions are also shown. (B) Densitometric analysis of Western blots of GSK3 α/β . Protein bands were scanned and quantified using multigaue image software v 3.0. The blot was probed with anti α -tubulin antibody as loading control. Results are expressed as percentage with respect to the control. Untreated cells (black bars) and L-BMAA treated cells (grey bars). Results are representative of three independent experiments. * Statistically significant difference from the corresponding control value ($p \leq 0.05$).

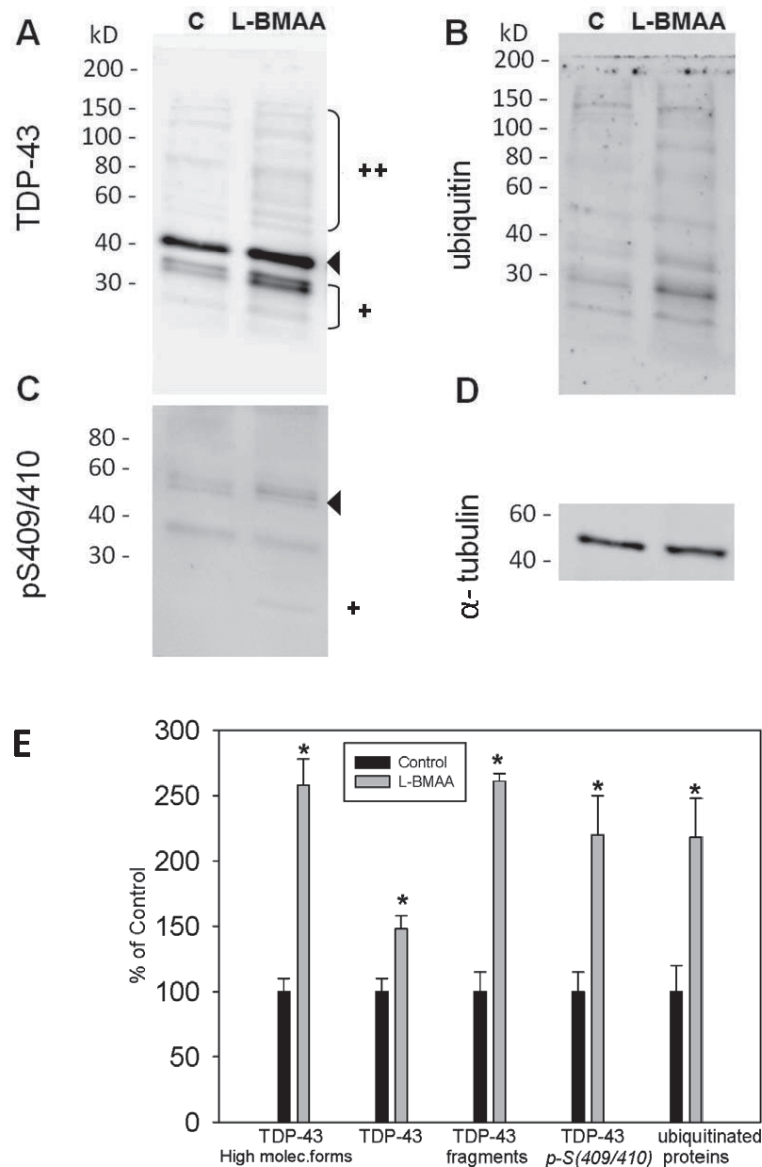


Fig. 3. Representative Western blots of SH-SY5Y neuroblastoma cell extracts in the absence (c) and in the presence 10 mM L-BMAA for 24 hr. (A) Analysis of different species of TDP-43, including bands of low molecular weight truncated fragments of TDP-43 (+) and bands of high molecular species of TDP-43 (++). (B) Ubiquitinated proteins corresponding to the same gel. (C) Levels of pS (409/410) TDP-43 corresponding to the same gel. (D) Blot with anti α -tubulin antibody as loading control. Results are representative of three independent experiments. (E) Quantitative analysis of TDP-43, high molecular forms of TDP-43, fragmented TDP-43, P-S (409/410)-TDP-43 and ubiquitinated proteins is shown. Results are expressed as a percentage with respect to the control. * Statistically significant difference from the corresponding control value ($p \leq 0.05$).

ronal death supports the theory that this aminoacid may serve as the etiologic agent for ALS/PDC syndrome.

Results obtained in this study indicate that L-BMAA causes neuronal death as observed by cellular viability evaluation. In the present study, the high concentra-

tion required inducing cell death may be due to immortalized cells undergo cell division, which could compensate for cell death. In this sense, high L-BMAA concentrations have been used by other authors in similar studies by using human neuroblastoma (Okle *et al.*, 2013; Lee and

McGeer, 2012).

Taking into account the changes observed in both GSK3 and TDP-43 in some neurodegenerative processes, we have investigated whether treatment with the neurotoxic amino acid evokes alterations in both proteins, in experimental conditions where L-BMAA causes cell death. We have found an increase in nuclear GSK3 β without a cytosol decrease. In this regard, we must point out that insults, that induce cell death can cause accumulation of GSK3 β in the nucleus prior to the activation of the caspase cascade (Bijur and Jope, 2001). In addition, it has been described an increased level of GSK3 β expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (Yang *et al.*, 2008). This enzyme is involved in normal and pathological tau phosphorylation (Balaraman *et al.*, 2006) and it can play a role in AD pathogenesis (Kremer *et al.*, 2011).

On the other hand, GSK3 β has been established as an antiapoptotic regulator of death receptor-induced extrinsic apoptosis, but this protective action occurs when GSK3 β is located in the cytosol (Beurel and Jope, 2006). Under basal conditions, GSK3 β is mostly cytosolic and associated with multiprotein complexes, which are their substrates (Meares and Jope, 2007). After stimulation, GSK3 β is released from protein anchors and is translocated to nucleus, where produces cell death (Bijur and Jope, 2001). Moreover, it has been implicated in important cellular functions achieved by GSK3 phosphorylation of numerous transcription factors (Sakamaki *et al.*, 2012). The results described herein indicate that the toxicity of L-BMAA would imply an increase of the synthesis of GSK3 β and a slight decrease of the inactive form of the enzyme. Therefore in response to L-BMAA treatment, GSK3 β is possibly translocated to the nucleus, contributing to the process of cell death. With regard to the increase of nuclear GSK3 α reported herein, it has been described that an accumulation of nuclear GSK3 α mediates some neurological disorders including AD (Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2011). Therefore, it is tentative to speculate that GSK3 α plays a role in the cellular death caused by L-BMAA treatment.

On the other hand, we must point out that TDP-43 plays an important role in the pathogenesis of motor neuron diseases and frontotemporal lobar degeneration. This protein is a major component of the characteristic ubiquitinated neuronal inclusions, which are hallmarks of these pathologies (Lee *et al.*, 2011). The appearance of aberrant forms of TDP-43 has been associated with mutations in this protein (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010). In the past few years, it has been reported that L-BMAA is bound into proteins, due to it can be bound to serine transfer RNA

and become part of the protein chain. This misincorporation of wrong proteinogenic aminoacid L-BMAA can lead to alterations in protein structures performing misfolded proteins in genetically susceptible individuals. In addition, neurons are extremely sensitive to misfolded proteins, possibly because these potentially toxic species cannot be diluted out of cell (Cox, 2009; Dunlop and Rodgers, 2011; Rodgers and Dunlop, 2011). It is noteworthy that Pablo *et al.*, (2009) have confirmed that protein-bound L-BMAA is present in the brains of patients with AD and ALS. Furthermore, the roles of environmental exposure and genetic predisposition in producing these diseases-related accumulation of L-BMAA have been reported (Vance *et al.*, 2010).

Our experiments indicate that neuroblastoma cells treated with L-BMAA present an increase in aberrant forms of TDP-43, similar to those found in the pathological TDP-43 aggregates, appearing in some neurodegenerative diseases. Therefore, it is tentative to speculate that these TDP-43 misfolded proteins could form aggregates related with neuronal injury. In addition, TDP-43 and other misfolded proteins could be ubiquitinated as a normal biological response to an aberrant protein modification.

In conclusion, this study demonstrates that L-BMAA produces cell death in human neuroblastoma and evokes alterations in GSK3 β and TDP-43, two possible biomarkers of neurodegenerative diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to express our gratefulness to Dr R.E. Catalan for critical reading of the manuscript and constant support for this study. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R. (1988): Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **48**, 589-601.
- Azoulay-Alfaguter, I., Yaffe, Y., Licht-Murava, A., Urbanska, M., Jaworski, J., Pietrokovski, S., Hirschberg, K. and Eldar-Finkelman, H. (2011): Distinct molecular regulation of glycogen synthase kinase-3 α isozyme controlled by its N-terminal region: functional role in calcium/calpain signaling. *J. Biol. Chem.*, **286**, 13470-13480.
- Balaraman, Y., Limaye, A.R., Levey, A.I. and Srinivasan, S. (2006): Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 1226-1235.
- Beurel, E. and Jope, R.S. (2006): The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.*, **79**, 173-189.

- Bijur, G.N. and Jope, R.S. (2001): Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37436-42.
- Brettschneider, J., Van Deerlin, V.M., Robinson, J.L., Kwong, L., Lee, E.B., Ali, Y.O., Safren, N., Monteiro, M.J., Toledo, J.B., Elman, L., McCluskey, L., Irwin, D.J., Grossman, M., Molina-Porcel, L., Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q. (2012): Pattern of ubiquilin pathology in ALS and FTL indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol.*, **123**, 825-839.
- Calcerrada, M.C., Miguel, B.G., Martín, L., Catalán, R.E. and Martínez, A.M. (2002): Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C ζ induced by C2-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett.*, **514**, 361-365.
- Chiu, A.S., Gehring, M.M., Braid, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H. and Neilan, B.A. (2012): Excitotoxic potential of the cyanotoxin β -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicol.*, **60**, 1159-65.
- Chung, Y.H., Joo, K.M., Kim, D.J., Kim, K.Y., Lee, W.B. and Cha, C.I. (2008): Immunohistochemical study on the distribution of glycogen synthase kinase 3 α in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice. *Neurol. Res.*, **30**, 926-931.
- Cox, P.A. (2009): Conclusion to the Symposium: the seven pillars of the cyanobacteria/BMAA hypothesis. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **10**, 124-126.
- Dunlop, R. and Rodgers, K. (2011): Proteins containing BMAA form autofluorescent aggregates and induce cell death. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **12 Suppl. 1**, 156.
- Holtkamp, W. (2012): The emerging science of BMAA. *Environmental Health Perspect.*, **120**, A110-A116.
- Karamyan, V.T. and Speth, R.C. (2008): Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.*, **82**, 233-246.
- Kremer, A., Louis, J.V., Jaworski, T. and Van Leuven, F. (2011): GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction. *Front. Mol. Neurosci.*, **4**, 17-24.
- Lee, M. and McGeer, P.L. (2012): Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiol. Aging*, **33**, 1440-1447.
- Lee, V.M., Lee, V.M.Y. and Trojanowski, J.Q. (2011): Gains or losses: molecular mechanisms of TDP-43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 38-50.
- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y.J., Vanderwyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L. and Wolozin, B. (2010): Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One*, **5**, e13250.
- Meares, G.P. and Jope, R.S. (2007): Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **282**, 19989-17001.
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U. and Dietrich, D.R. (2013): L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low non excitotoxic concentrations. *Toxicol. Sci.*, **131**, 217-224.
- Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A. and Mash D.C. (2009): Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.*, **120**, 216-225.
- Rodgers, K. and Dunlop, R. (2011): The cyanobacteria-derived BMAA can be incorporated into cell proteins and could thus be an environmental trigger for ALS and other neurological diseases associated with protein misfolding. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **12 Suppl. 1**, 22.
- Ross, S.M., Seelig, M. and Spencer, P.S. (1987): Specific antagonism of excitotoxic action of "uncommon" amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res.*, **425**, 120-127.
- Sakamaki, J., Daitoku, H., Kaneko, Y., Hagiwara, A. and Fukamizu, A. (2012): GSK3 β regulates gluconeogenic gene expression through HNF4 α and FOXO1. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **32**, 96-101.
- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A. and Arias, C. (2011): GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity and neurodegeneration. *Int. J. Alzheimer Dis.*, **2011**, 189728.
- Sutherland, C., Leighton, I.A. and Cohen, P. (1993): Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.*, **296**, 15-19.
- Vance, J.M., Ali, S., Bradley, W.G., Singer, C. and Di Monte, D. (2010): Gene-environment interactions in Parkinson's disease and other forms of parkinsonism. *Neurotoxicology*, **31**, 598-602.
- Xie, H., Hu, L. and Li, G. (2010): SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.*, **123**, 1086-1092.
- Yamamoto, A. and Simonsen, A. (2011): The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 17-28.
- Yang, W., Leysstra-Lantz, C. and Strong, M.J. (2008): Upregulation of GSK3 β expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). *Brain Res.*, **1196**, 131-139.